

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATÁLIA NUNES DE MELO

DIFERENTES TEMPOS DE ENSILAGEM NA ROTINA EXPERIMENTAL PODEM
INFLUENCIAR RESULTADOS DE ENSAIOS EXPERIMENTAIS

CURITIBA

2021

NATÁLIA NUNES DE MELO

DIFERENTES TEMPOS DE ENSILAGEM NA ROTINA EXPERIMENTAL PODEM
INFLUENCIAR RESULTADOS DE ENSAIOS EXPERIMENTAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração Nutrição e Produção Animal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Patrick Schmidt

CURITIBA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Melo, Natália Nunes de

Diferentes tempos de ensilagem na rotina experimental podem influenciar resultados de ensaios experimentais. / Natália Nunes de Melo. - Curitiba, 2021.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Orientador: Patrick Schmidt.

1. Bactérias produtoras de ácido láctico. 2. Ensilagem - Pesquisa experimental. 3. Inoculantes microbianos. I. Schmidt, Patrick. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA -
40001016082P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NATÁLIA NUNES DE MELO** intitulada: **DIFERENTES TEMPOS DE ENSILAGEM NA ROTINA EXPERIMENTAL PODEM INFLUENCIAR RESULTADOS DE ENSAIOS COM SILAGENS**, sob orientação do Prof. Dr. PATRICK SCHMIDT, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 05 de Março de 2021.

Assinatura Eletrônica

05/03/2021 16:05:56.0

PATRICK SCHMIDT

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/03/2021 15:02:19.0

VALTER HARRY BUMBIERIS JUNIOR

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

Assinatura Eletrônica

05/03/2021 15:03:18.0

MAITY ZOPOLLATTO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Em 21 de março de 2021, a banca sugeriu alteração de título de:
"DIFERENTES TEMPOS DE ENSILAGEM NA ROTINA EXPERIMENTAL
PODEM INFLUENCIAR RESULTADOS DE ENSAIOS COM SILAGENS"
para: "DIFERENTES TEMPOS DE ENSILAGEM NA ROTINA EXPERIMENTAL
PODEM INFLUENCIAR RESULTADOS DE ENSAIOS EXPERIMENTAIS".

Curitiba, 23 de abril de 2021.

Maity Zopollatto - Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia

Rua dos Funcionários, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80035-050 - Tel: (41) 3350-5861 - E-mail: ppgz@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 80123

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 80123

À Deus, que sempre foi folego de vida em mim e o meu sustento, me dando coragem para prosseguir questionando e a propor sempre um mundo novo de possibilidades. Aos meus pais e irmã, que sempre me incentivaram e auxiliaram na realização dos meus sonhos,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me fortalecer e me fazer acreditar que é possível! Por ser amparo nos momentos difíceis e por ter guiado os meus passos pelos melhores caminhos, ainda que eles não tenham sido os mais fáceis.

Aos meus pais, Marcos e Janete, por todo amor incondicional, por ser uma das minhas fontes de inspiração, persistência e fé, pelo apoio e por me incentivar a ir atrás dos meus sonhos. Por ser meu porto seguro e estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, fazendo o possível e o impossível para me ver feliz. Eu amo muito vocês!

À minha irmã, Júlia, pela amizade e parceria. Por ser tão presente, mesmo com a distância física de muitos quilômetros. Sempre sinto e levo o seu amor por onde eu vou.

A minha vó Lúcia, vó Sic e vizinha. Minhas tias, Joice, Jussara e Geisa e minhas primas, Iasmin e Renata por sempre me lembrarem do quanto eu sou amada e que eu sempre tenho para onde voltar. Sem dúvidas, são responsáveis por deixar a minha vida mais leve.

À Lígia Lins, por ter me incentivado a fazer o processo seletivo da UFPR e por sempre ter acreditado no meu potencial.

À toda a equipe do LaPNAR, onde eu comecei a me apaixonar pela pesquisa, em especial ao professor José Augusto e a Alana Dias.

À Andressa, Luana e Jéssica, para além da amizade, foram a minha família em Curitiba, sempre me lembrarei com carinho dos momentos compartilhados.

Ao seu Romeu e Dona Judi, por ter me acolhido.

À Mari e a Duda pela amizade.

Ao professor e orientador, Patrick Schmidt, pela oportunidade e disponibilidade em partilhar o seu conhecimento. Pelo profissionalismo e inúmeros ensinamentos durante esses dois anos. Sempre serei grata!

A toda equipe do CPFOR, em especial a minha amiga, Queila Tavares, por ter compartilhado comigo muitos momentos importantes e difíceis, tenho certeza que o elo formado aqui ficará para sempre. Obrigada pelo companheirismo no laboratório, no campo, nas aulas, nos estudos e pela amizade.

Aos membros do Comitê de Orientação, Profa. Dra. Maity Zopollatto e Dr. Charles Novinski pelas estimadas contribuições.

À Sílvia Igarashi, pelo cuidado, atenção e disposição em sempre ajudar.

À Maryon, pelo auxílio com as análises estatísticas e pela prestatividade.

Aos funcionários da fazenda Canguiri, pela prontidão na ajuda nos trabalhos de campo.

Aos professores do Departamento de Zootecnia e Agronomia pela troca, convivência e experiência transmitida durante a realização do curso.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pela amizade e companheirismo, em especial a Letícia Custódio.

A todos os meus amigos, que sempre me impulsionaram a dar o melhor de mim em tudo que ousei fazer, que foram a minha válvula de escape e calma nos momentos de desespero, vocês são os melhores amigos que uma pessoa poderia ter (são muitos e todos eles sabem).

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À empresa *Pioneer* pelo financiamento da pesquisa.

E a todos aqueles que, embora não mencionados, contribuíram de alguma forma durante essa etapa da minha vida, o meu muito obrigada!

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito e nem sofrem muito porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem a vitória, nem a derrota (Theodore Roosevelt).

RESUMO

A metodologia empregada na avaliação de um ensaio experimental e o manejo do processo de ensilagem influenciam diretamente na conservação do material ensilado e nos resultados obtidos. Este estudo teve como objetivo avaliar diferentes tempos entre a picagem e a compactação sobre a qualidade, perdas fermentativas e estabilidade aeróbia de silagens de milho, e o efeito dos tempos sobre a magnitude das respostas ao uso de inoculante bacteriano. O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisas em Forragicultura (CPFOR), da Universidade Federal do Paraná. O milho foi colhido com 29,3% de matéria seca (MS). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2. Foram avaliados quatro tempos de ensilagem (30', 90', 150' e 210') e dois aditivos (Controle x Inoculante Comercial *Pioneer 11C33*), totalizando 40 unidades experimentais (5 repetições/tempo/aditivo). As silagens foram confeccionadas em silos experimentais e armazenadas por 55 dias, nas quais foram determinados o pH e os teores de MS, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), proteína bruta (PB), proteína solúvel (PS), cinzas, extrato etéreo (EE), lignina, amido, ácidos orgânicos, etanol, perdas por gases, efluentes, perdas totais de MS e contagens microbianas de bactérias ácido lácticas (BAL), leveduras e fungos filamentosos. A estabilidade aeróbia (EA) foi avaliada por 213 horas. O pH não foi influenciado pelo inoculante, mas houve efeito significativo dos tempos avaliados e da interação (tempo x aditivo). As silagens inoculadas influenciaram positivamente os teores de MS, PB, cinzas, EE e amido. Os tempos influenciaram o pH, MS, FDN, FDA, PB, PS, EE, lignina e amido. Verificou-se interação tempo x inoculante para o pH, MS, FDN, PB, PS, EE e amido. As silagens inoculadas apresentaram maior produção de etanol e ácido acético, enquanto as silagens não inoculadas (controle) apresentaram maior teor de ácido láctico. A produção de gases da fermentação (litros) foi influenciada pelo tempo e pelo uso do inoculante, assim como as perdas de MS. As contagens microbianas não apresentaram efeitos de tratamentos, embora o uso do inoculante tenha apresentado tendência de aumento na contagem de BAL. O inoculante elevou significativamente a estabilidade do material em aerobiose, e o tempo de ensilagem aumentou a EA das silagens controle. A silagem inoculada apresentou menores perdas de MS durante a EA. Os tempos propostos neste estudo, se ignorados, podem interferir nos resultados dos ensaios experimentais, o descuido do tempo de ensilagem pode gerar resultados equivocados. O uso do inoculante foi ineficiente em reduzir as perdas fermentativas, mas elevou a estabilidade aeróbia e elevou o valor nutricional das silagens.

Palavras-chave: bactérias ácido lácticas, gases, inoculante, metodologia, silo experimental.

ABSTRACT

The methodology used for experimental trials and the ensiling process handling directly influence the results of silage conservation. This study aimed to evaluate different time intervals between chopping and compaction for lab trials on the fermentative losses and aerobic stability of corn silages. Time effect over bacterial inoculant responses were also assessed. The experiment was performed at the Forage Research Center (CPFOR) from the Federal University of Paraná, Brazil. Whole plant corn was harvested at 29.3% of dry matter (DM). The experimental design was completely randomized in a 4x2 factorial scheme. Four times (30', 90', 150' and 210') and two additives (Control x Pioneer 11C33 Inoculant) were evaluated, reaching 40 experimental units (5 replicate/time/additive). The silages were made in lab silos and stored for 55 days. They were evaluated: silage pH and DM content, neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), crude protein (CP), soluble protein (SP), ash, ether extract (EE), lignin, starch, organic acids, ethanol, gas losses, effluents, total DM losses and microbial counts of lactic acid bacteria (LAB), yeasts, and filamentous fungi. Aerobic stability (AS) was evaluated for 213 hours. The inoculant did not influence the pH, but there was a significant effect on the time and interactions evaluated (time vs. additive). The inoculated silages positively influenced the levels of DM, CP, ashes, EE, and starch. The time influenced pH, DM, NDF, ADF, CP, SP, EE, lignin, and starch. Time vs. inoculant interactions were verified for pH, DM, NDF, CP, SP, EE, and starch. The inoculated silages showed higher acetic acid as well as ethanol content, while the control silages showed higher lactic acid content. Fermentative gas production (liters) and DM losses were influenced by time and inoculant use. Microbial counts did not show treatment effects, although the inoculated silages showed an increased tendency in LAB counts. The inoculant significantly increased the aerobic stability of the material, and ensiling time increased the AE of control silages. Inoculated silages showed the lowest DM losses during AE. The proposed times in this study, if ignored, can interfere with the results of the experimental test. The neglect of ensiling time can generate wrong interpretation of the trial results. The inoculant use was inefficient in reducing fermentative losses; however, it increased aerobic stability and silages nutritional values.

Keywords: lactic acid bacteria, gas, inoculant, methodology, experimental silos.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PRECIPITAÇÃO, UMIDADE RELATIVA DO AR E TEMPERATURA MÉDIA DO PERÍODO DO PLANTIO ATÉ A COLHEITA DO MILHO.....	40
FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA COMPOSTO POR DISPOSITIVO COLETOR DE GÁS (GCD) E EFLUENTE (ECD)	43
FIGURA 3 – PRODUÇÃO MÉDIA DE GASES ACUMULADA (L/kg MS) NO TRATAMENTO ADITIVADO (A) E NO TRATAMENTO CONTROLE (B) ..	59
FIGURA 4 – CURVA DE pH ENTRE OS TRATAMENTOS CONTROLE (A) E ADITIVADO (B) NOS DIFERENTES TEMPOS AVALIADOS DURANTE A O TESTE DE ESTABILIDADE AERÓBIA	64
FIGURA 5 – VARIAÇÃO NA TEMPERATURA DURANTE A AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE AERÓBIA DAS SILAGENS	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – INTERVALOS DE TEMPO ENTRE AS ETAPAS DO PROCESSO DE ENSILAGEM	41
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DA PLANTA DE MILHO ANTES DA ENSILAGEM NOS QUATRO TEMPOS AVALIADOS (30 A 210 MINUTOS)	45
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA E PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO DAS SILAGENS DE MILHO EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS) INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	49
TABELA 4 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O pH DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	52
TABELA 5 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE MS DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	52
TABELA 6 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE FDN DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	53
TABELA 7 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE FDA DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	53
TABELA 8 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE AMIDO DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	54
TABELA 9 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE PB DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	55
TABELA 10 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE PS DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	56
TABELA 11 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE EE DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	56
TABELA 12 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA A PERDA DE MS DA SILAGEM DURANTE A FERMENTAÇÃO, EM	

QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	57
TABELA 13 – PRODUÇÃO DE GASES E PERDAS FERMENTATIVAS DAS SILAGENS DE MILHO, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	58
TABELA 14 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA A PRODUÇÃO DE GASES EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>PIONEER 11C33</i>	58
TABELA 15 – CONTAGENS MICROBIANAS EM SILAGENS DE MILHO EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	61
TABELA 16 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA A EA DAS SILAGENS NOS QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	62
TABELA 17 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA A PMSea DAS SILAGENS NOS QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM <i>Pioneer 11C33</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
BAL	Bactérias Ácido Láticas
°C	Graus celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
COV	Compostos orgânicos voláteis
CPFOR	Centro de Pesquisas em Forragicultura
CS	Carboidratos Solúveis
EPM	Erro Padrão da Média
EA	Estabilidade Aeróbia
EE	Extrato Etéreo
FDA	Fibra insolúvel em Detergente Ácido
FDN	Fibra insolúvel em Detergente Neutro
ha	Hectare
mm	Milímetros
MS	Matéria seca
NNP	Nitrogênio não proteico
O ₂	Oxigênio
PB	Proteína Bruta
PG	Perda por gases
PGtrad	Perda por gases calculada pela equação tradicional, por diferença de peso bruto dos silos antes e depois da ensilagem
pH	Potencial de hidrogênio
PMS	Perda de Matéria Seca
PMSea	Perda de Matéria Seca durante estabilidade aeróbia
t	Tonelada
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	PARTICULARIDADES DA PLANTA DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE SILAGEM	19
2.2	ENSILAGEM.....	20
2.3	SILOS LABORATORIAIS.....	21
2.4	EFEITOS DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO DA FORRAGEM PICADA AO AR ANTES DA ENSILAGEM	22
2.5	MICRORGANISMOS (DESEJÁVEIS X INDESEJÁVEIS).....	25
2.6	PRODUÇÃO DE GASES DURANTE A FASE FERMENTATIVA DE SILAGENS	26
2.7	ADITIVOS MICROBIANOS	27
2.8	ESTABILIDADE EM AEROBIOSE.....	30
	REFERÊNCIAS	32
3	CAPÍTULO II – PERDAS FERMENTATIVAS, MICROBIOLOGIA E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE MILHO ENSILADAS EM 4 TEMPOS DIFERENTES COM USO OU NÃO DE INOCULANTE MICROBIANO	38
3.1	INTRODUÇÃO.....	38
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.2.1	Local.....	39
3.2.1.1	Condições climáticas durante o a condução da cultura.....	39
3.2.2	Implantação da cultura e tratos culturais.....	40
3.2.3	Tratamentos	41
3.2.4	Ensilagem do milho.....	41
3.2.5	Avaliação da produção de gases.....	43
3.2.6	Abertura dos silos experimentais	44
3.2.7	Amostragens.....	44
3.2.7.1	Coleta de amostras na ensilagem	44
3.2.7.2	Coletas de amostras na abertura dos silos experimentais.....	45

3.2.8	Análises	45
3.2.9	Delineamento experimental e análise estatística	47
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4	CONCLUSÕES	67
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

As silagens têm sido produzidas há muitos séculos, mas apenas recentemente técnicas têm sido desenvolvidas para avaliar os efeitos do processo de ensilagem sobre a qualidade da massa ensilada (CHERNEY; CHERNEY, 2003). Nesse sentido, o desenvolvimento dessas técnicas perpassa pela acurácia dos ensaios experimentais, tendo como base a assertividade na sua condução.

Existem inúmeras metodologias que têm sido empregadas na avaliação de forrageiras conservadas, sobretudo silagens. Entretanto, é evidente a disparidade entre elas e a necessidade de pesquisas que objetivem o aperfeiçoamento das metodologias já existentes, colocando em discussão a necessidade de padronização de procedimentos analíticos realizados experimentalmente e que viabilizem a comparação idônea de valores obtidos entre os diferentes grupos de pesquisas.

Alguns parâmetros são considerados fundamentais para a determinação da qualidade da massa ensilada, dentre eles destaca-se o teor de carboidratos solúveis. A magnitude das perdas desses compostos durante o processamento da forragem é determinante para o processo fermentativo das silagens produzidas, e está diretamente correlacionado com o tempo de exposição da forragem antes de ser ensilada.

A adição de inoculantes bacterianos nas silagens tem por finalidade favorecer a fermentação, podendo ainda minimizar os danos causados por microrganismos aeróbicos no momento de abertura dos silos. Nessa perspectiva, a inserção do inoculante nessa pesquisa objetiva avaliar a influência dos diferentes tempos de ensilagem na efetividade do inoculante utilizado.

Metodologias acuradas, que possibilitam e asseguram o monitoramento do tempo de ensilagem de forma igualitária para todos os tratamentos avaliados, são determinantes para os resultados obtidos durante os ensaios experimentais. Para tanto, o presente trabalho tem o intuito de contribuir com a avaliação metodológica dos experimentos com produção de silagens.

Para facilitar a discussão e entendimento dos dados que serão apresentados nessa dissertação, a mesma foi redigida em forma de capítulos, onde:

- O capítulo I, trata-se de uma revisão bibliográfica dos fundamentos necessários à compreensão do contexto da pesquisa. Revisa a literatura acerca das metodologias usadas para avaliação de silagens, a importância dos silos experimentais, e os fatores que interferem nas avaliações e na qualidade da massa ensilada, com foco principal no tempo decorrido entre colheita e vedação dos silos.

- O capítulo II, intitulado: Perdas fermentativas, estabilidade aeróbia e microbiologia de silagens de milho ensiladas em 4 tempos diferentes com uso ou não de inoculante microbiano, que tem como objetivo avaliar os diferentes tempos entre picagem e vedação sobre a qualidade, perdas fermentativas e estabilidade aeróbia de silagens de milho, e o efeito desses sobre a magnitude das respostas ao uso de inoculante bacteriano.

2 **CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA**

2.1 **PARTICULARIDADES DA PLANTA DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE SILAGEM**

A planta de milho é considerada padrão para a produção de silagens seja pela elevada produtividade ou pelo bom valor nutritivo e, geralmente, é considerada referência para comparação de valor com outras silagens (HENRIQUE et al., 1998). Além disso, apresenta características consideradas ótimas para o processo de fermentação, tais como: teor de matéria seca entre 30% e 35% no momento do corte, mais de 3% de carboidratos solúveis na matéria original e baixo poder tampão quando colhida na maturidade adequada (NUSSIO et al., 2001). De acordo com Fancelli (2000), pode ser considerada uma cultura tradicional que ocupa posição significativa no contexto nacional quanto ao valor da produção agropecuária, área cultivada e volume produzido, especialmente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil.

A silagem de planta inteira de milho é o volumoso mais utilizado para bovinos leiteiros em todo o mundo (FERRARETTO et al., 2017). Dentre as inúmeras plantas possíveis de serem ensiladas, o milho é cada vez mais recomendado, e vários são os fatores que justificam a preferência por essa forrageira, dentre eles: facilidade de cultivo, grande variedade de cultivares disponíveis e adaptadas a várias regiões do país e do mundo, facilidade de fermentação, boa composição bromatológica e, principalmente, a elevada aceitabilidade pelos animais (RESTLE et al., 2002).

Para a nutrição animal, a planta de milho apresenta dois componentes distintos e de extrema importância: a fração vegetativa, composta basicamente de carboidratos estruturais, e a fração granífera, representada principalmente pelo amido do endosperma (FERREIRA, 2001). É um alimento volumoso nutricionalmente completo, com alta densidade energética (maior que 64% de nutrientes digestíveis totais - NDT) e com teores moderados de proteína bruta (PB - 6 a 9%) (FACTORI, 2008). Apesar da relevância da silagem de milho, é importante destacar a grande oscilação em relação às propriedades nutricionais, físicas e químicas dessa forrageira, uma vez que existem fatores que interferem diretamente na composição bromatológica e, consequentemente, na qualidade nutricional da planta. Dentre eles pode-se enumerar: a condução da lavoura, a escolha do híbrido e o manejo de ensilagem.

O emprego correto das técnicas de ensilagem, bem como o manejo do sistema de produção da cultura, são os responsáveis pelo adequado processo fermentativo e, como

consequência, a redução dos custos de produção e melhoria na qualidade da silagem, que possibilita a manutenção do valor nutricional da massa ensilada até o fornecimento aos animais.

A produção de silagem de alta qualidade está estritamente ligada a fatores controláveis e incontroláveis que podem afetar adversamente a produção e a utilização da mesma (BERNARDES et al., 2018) e, dentre esses, a escolha da cultivar é um fator importante para o sucesso do processo de conservação.

2.2 ENSILAGEM

A técnica de ensilagem consiste no consumo de carboidratos solúveis por bactérias ácido lácticas em anaerobiose, transformando-os em ácidos orgânicos, o que ocasiona a queda do pH e a eliminação da ação de microrganismos que deteriorariam o material (JOBIM e NUSSIO, 2013).

O processo de ensilagem é influenciado tanto por fatores biológicos como tecnológicos (manejo e técnicas de ensilagem), os quais, em sua maioria, encontram-se interrelacionados, dificultando a discussão individual dos mesmos (PEREIRA et al., 2004).

De acordo com McDonald et al. (1991), as perdas no processo de ensilagem podem variar significativamente entre 7 a mais de 40%, e estão atreladas a forma como é conduzido o processo de ensilagem. Por isso, deve-se prestar atenção e ter cuidado especial em todas as etapas de produção, para garantir que ao final do processo o produto esteja de acordo com as características quantitativas e qualitativas esperadas.

O processo de ensilagem pode ser dividido em quatro fases: 1) aeróbia, 2) fermentativa, 3) estabilidade e 4) alimentação (COLLINS e OWENS, 2003).

A primeira fase acontece durante o enchimento do silo, estendendo-se até que haja o consumo do oxigênio presente na massa após o fechamento do mesmo. Nessa fase, o oxigênio presente na massa ensilada é diminuído devido à respiração de células da planta e de microrganismos aeróbicos e aeróbios facultativos, como leveduras e enterobactérias. A correta picagem e o rápido fechamento do silo contribuem para minimizar essa fase, que acabará quando todo o oxigênio presente for esgotado (McDONALD et al., 1991).

Com o esgotamento do oxigênio e a modificação para um ambiente anaeróbico inicia-se a fase fermentativa (segunda fase), que tem a duração de uma a quatro semanas (MUCK e PITT, 1993) dependendo das propriedades da forrageira ensilada e do manejo de ensilagem. Com o ambiente exaurido do oxigênio, a fermentação anaeróbia inicia-se pelo crescimento de enterobactérias (produtoras de ácido acético) que normalmente crescem nos primeiros dias de

ensilagem, no entanto, a sua população decresce à medida que o meio é acidificado, sendo inibidas em pH abaixo de 5 (PAHLOW et al., 2003). Com o ambiente anaeróbio ocorre também a proliferação de bactérias ácido lácticas (BAL), homo e heterofermentativas. As BAL são as responsáveis pela queda do pH que, de acordo Pereira et al. (2004), atinge valores entre 3,8 - 4,5. Com a exclusão de oxigênio sustentada, a fase de estabilidade é mantida até a abertura do silo, caracterizando assim a terceira fase (fase de estabilidade). A quarta fase, ou fase de alimentação, acontece após a abertura do silo, onde a massa passa a ter contato novamente com o oxigênio e haverá o favorecimento da atividade de microrganismos como leveduras e fungos filamentosos, que são responsáveis por deteriorar a silagem. Esta deterioração se manifestará através da produção de calor e CO₂ (respiração), diminuição da concentração de ácido láctico e aumento de pH, além do decréscimo no valor nutricional da silagem (TOMICICH et al., 2003).

No processo de ensilagem o princípio de conservação da forragem é a redução do pH pela fermentação dos açúcares solúveis da planta. Dessa forma, as melhores forrageiras para ensilagem são aquelas com elevado teor de açúcares solúveis.

2.3 SILOS LABORATORIAIS

São inúmeros os fatores que influenciam a qualidade da silagem, o que torna praticamente impossível que os estudos sejam realizados somente em silos convencionais de fazenda (HARGREAVES et al., 1986). A avaliação dos efeitos dos inoculantes na composição microbiana e no valor nutricional da silagem usando silos em escala de campo é um grande desafio devido à dificuldade de produzir silagem homogênea para avaliação dos tratamentos (CHERNEY e CHERNEY, 2003). Dessa maneira, esforços são destinados na busca de silos experimentais que possibilitem o máximo controle dos fatores que interferem nos processos fermentativos.

A literatura mostra uma grande variedade de silos que são utilizados para a pesquisa, sendo estes construídos com uma ampla diversidade de materiais e formatos (tubos de PVC, baldes e sacos plásticos, bolsas de polietileno, jarros de vidro, tambores de plástico ou manilhas de concreto). A sua aplicação na pesquisa não é recente; Barcock et al. (1901), citado por Junges (2010), utilizaram silos de ferro para a avaliação de silagens. Entretanto, embora acredite-se que estas unidades de experimentação sejam válidas para a reprodução das condições básicas para a avaliação das silagens, é importante se atentar que os resultados obtidos em nível experimental nem sempre são condizentes àqueles observados no campo, já que, segundo Rodrigues et al. (2002), é possível inferir que o tipo de silo utilizado pode alterar as

características da forragem e, adicionalmente, que silagens produzidas em silos experimentais exibem melhores características fermentativas quando comparadas às silagens provenientes de silos de grande escala.

Neumann et al. (2007) compararam dois tipos de silo (experimental de PVC e semitrincheira) e verificaram que a composição de silagens, confeccionadas em silo de laboratório (PVC) e em silo de campo (semitrincheira), pode diferir dependendo do parâmetro avaliado, e que as silagens produzidas nos dois tipos de silo diferiram quanto aos teores de matéria orgânica, FDN e N amoniacal, como também diferiram quanto ao grau de acidez (pH), densidade e perdas de PB e FDN.

O uso de silos experimentais é uma ferramenta estritamente necessária e válida para os ensaios de pesquisa. Quando o objetivo é comparar tratamentos, os silos laboratoriais tornam-se a melhor escolha, pois admitem que os efeitos aleatórios do ambiente sejam minimizados. Os silos laboratoriais fornecem um controle mais completo das condições de ensilagem e permitem aplicar muitas repetições de tratamento. Por isso têm sido amplamente utilizados quando vários tratamentos são testados (CHERNEY e CHERNEY, 2003). O modelo de avaliação de perdas fermentativas nesses silos apresenta maior sensibilidade e acurácia (SOUZA, 2015).

Outras razões para a utilização de silos experimentais são a redução dos custos, a facilidade de manejo e a detecção de alterações mínimas nas características avaliadas. Muitos experimentos avaliam o uso de aditivos (químicos ou biológicos) sobre a redução de perdas fermentativas. A alteração nessa variável muitas vezes é mínima e por isso sua mensuração só é possível em silos de menor escala.

2.4 EFEITOS DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO DA FORRAGEM PICADA AO AR ANTES DA ENSILAGEM

As silagens podem ter sua composição bromatológica alterada em função dos fenômenos bioquímicos e microbiológicos que ocorrem durante o processo de ensilagem (JOBIM et al., 2007) e as perdas estão diretamente relacionadas às alterações nutricionais das forragens, que dependem das características da planta no momento do corte e das práticas de ensilagem (NEUMANN et al., 2007). Embora seja conhecido o efeito danoso de certas práticas, nem sempre é possível controlar todas elas. Fatores como: padrões climáticos atípicos (longos período de estiagem, veranicos ou fortes chuvas repentinas), dependência de maquinário

alugado para ensilagem e mão-de-obra insuficiente são fatores que podem, por exemplo, atrasar o início e fim da ensilagem e comprometer todo o processo.

Após o corte, diversas reações enzimáticas de oxidação e respiração ocorrem com a planta até a vedação dos silos. Dentre essas, a respiração é o principal processo fisiológico que continua a ocorrer pós-colheita. Trata-se do processo de oxidação de moléculas complexas (amido, açúcares solúveis e não solúveis, lipídeos e proteínas) a moléculas mais simples como CO_2 e H_2O (WILLS et al., 1998). A principal perda ocorre na fração dos carboidratos solúveis, sendo secundariamente os demais substratos (amido, lipídeos e proteínas) quebrados e/ou transformados em açúcares solúveis para poderem atuar como fontes à respiração (PEIXOTO et al., 2020).

Todo esse processo de oxidação e respiração após o corte causa perdas significativas de matéria seca e redução da concentração de carboidratos rapidamente fermentáveis (MUCK, 1988). Velho et al. (2006) mostraram que os teores de açúcares solúveis das silagens de milho diminuíram consideravelmente durante os tempos de exposição ao ar de 12, 24 e 36 horas antes da ensilagem, onde a silagem produzida após 36 horas apresentou 34,7% menos açúcares solúveis que a silagem produzida imediatamente após a colheita das plantas. Brüning et al. (2018) também observaram o mesmo efeito sobre as concentrações de MS, cinza bruta, PB, FDN, amido e NNP em silagens de milho produzidas em escala laboratorial e concluíram que o atraso na vedação dos silos em 4 dias elevou as perdas de MS em até 11% e reduziu cerca de 65% dos carboidratos solúveis das silagens.

Além de alterações relacionadas à composição química, o tempo em que a planta permanece exposta ao ar entre a picagem e a vedação do silo também pode modificar a microflora epifítica. Isso pode ser atribuído aos processos respiratórios prolongados por enzimas vegetais ou vários microrganismos aeróbios epifíticos competindo com bactérias ácido lácticas por carboidratos fermentáveis (PAHLOW et al., 2003).

Como consequência das alterações químicas e microbiológicas pós-colheita, a fermentação da planta será diferente e, consequentemente, a concentração de ácidos orgânicos preconizados e necessários para a produção de uma silagem de alta qualidade nutricional e sanitária também será afetada. Em estudo realizado por Weiss et al. (2016), avaliando 3 diferentes tempos de ensilagem (0, 16 e 24 horas), os autores afirmam que as concentrações de ácido láctico nas silagens controle ensiladas sem atrasos para a vedação são maiores do que em silagens com atraso. Da mesma forma, Mills e Kung (2002), em estudo com silagem de cevada, relataram que a exposição ao ar antes da ensilagem (24 horas) resultou em silagens com menos 3,3% ácido láctico em média do que silagens de forragens ensiladas imediatamente (até 5,71%).

Como efeito colateral às alterações nos compostos orgânicos voláteis, a resistência da silagem à degradação quando exposta ao ar é reduzida. Corroborando com essa afirmação, Mills e Kung (2002) mostraram que a exposição prolongada ao ar antes da ensilagem (24 horas) aumentou o número de leveduras nas forragens em mais de 1000 vezes. Em consonância, Cai et al. (2020), avaliando a influência do inoculante microbiano nas populações microbianas, características de ensilagem e perda por deterioração da silagem de capim Napier, observaram que nas silagens com 24 horas de atraso para vedação a contagem de leveduras e fungos filamentosos aumentou rapidamente durante a exposição aeróbia e atingiu valores de 9,43 e 6,93 log 10 UFC/g numa base de matéria fresca após 6 dias. Com o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, observou-se também o aumento do pH e da temperatura, e redução do teor de ácido lático. Brüning et al. (2018) também observaram que o atraso na vedação causou aumento na contagem de leveduras, possivelmente decorrente da exposição prolongada ao ar na fase de pré-vedação, ocasionando o desenvolvimento de maior população crítica de leveduras que sobreviveram em parte ao processo de ensilagem em estágio de repouso e, após reexposição ao ar na fase de abertura, teria causado rápida proliferação de leveduras, que por conseguinte contribui consideravelmente para a quebra mais rápida da estabilidade da massa ensilada.

Embora seja considerada a mesma planta, oriunda da mesma área, cultivada e colhida de igual forma, todas essas ações e reações pós-colheita influenciarão no tipo de material que entrará no silo e, conseqüentemente, no produto final. Esse efeito é especialmente importante ao se considerar a rotina de montagem de experimentos com silagens, onde muitas vezes um tratamento é preparado de cada vez, podendo os últimos tratamentos serem produzidos com forragens expostas ao ar por longo período antes da ensilagem.

A eficácia da conservação das características químico-bromatológicas da cultura requer que a respiração seja limitada o mais rápido possível e, para isso, atingir a anaerobiose no silo é primordial. Com a extensão do processo respiratório da forrageira pós-colheita, retarda-se o início do declínio do pH e possibilita que atividades prejudiciais à qualidade da planta, como a degradação pelos microrganismos aeróbios continuem ocorrendo. A quantidade de carboidratos solúveis perdidos através da respiração aeróbia tem grande influência na preservação da massa ensilada, visto que este é o principal substrato para as bactérias ácido lácticas (PEDROSO et al., 1988). Como consequência das perdas de carboidratos solúveis, as concentrações de PB, FDN, FDA, LIG e de outras frações não afetadas pela respiração aumentam em proporção (ROTZ e MUCK, 1994).

Na literatura pode-se encontrar vários artigos avaliando o efeito do atraso de vedação em silos experimentais e a campo (MILLS e KUNG, 2002; VELHO et al. 2006; WEISS et al. 2016; BRÜNING et al. 2018), todavia, estes trabalhos apresentam tempos de exposição relativamente grandes (>10h), buscando avaliações em nível de campo para justificar os prejuízos ocasionados pela exposição aeróbia da forragem antes da ensilagem. Contudo, embora aparentemente controlado em situações de pesquisa, o tempo total decorrido entre o início e fim da ensilagem também pode ser longo, por exemplo, por questões de logística, mão-de-obra e volume de material a ser ensilado, os quais poderão favorecer ou prejudicar certos tratamentos, dependendo da forma como o trabalho for conduzido. Pouco se sabe sobre os efeitos em escala de tempo menor em condições experimentais, o que o torna um assunto extremamente pertinente uma vez que os resultados das pesquisas serão aplicados em campo, podendo levar a conclusões equivocadas.

2.5 MICRORGANISMOS (DESEJÁVEIS X INDESEJÁVEIS)

A composição microbiológica do material ensilado tem grande influência sobre a qualidade da silagem produzida, e a população epifítica da forragem é a grande responsável pela dinâmica do processo de fermentação.

Advindas do campo, junto com as forrageiras são encontradas bactérias ácido lácticas, microrganismos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, que durante o processo de conservação sofrem alterações nas espécies e tamanho de suas populações (LIN et al., 1992).

Previsivelmente, as populações dominantes são microrganismos aeróbios ou aeróbios facultativos. As bactérias ácido lácticas, das quais dependemos para a fermentação, geralmente são de ordens de magnitude mais baixas em população do que outros grupos de microrganismos (MUCK, 2010). Assim sendo, a principal responsável pelas variações microbiológicas que ocasionam a conservação da silagem é a mudança de ambiente dentro do próprio silo, onde o material passa a ter contato com uma atmosfera anaeróbia e crescentemente ácida, vantajosa para o desenvolvimento e proliferação de bactérias ácido lácticas que contribuem positivamente para a conservação do material, levando à fermentação láctica (PAHLOW et al., 2003).

Nessa perspectiva, o desenvolvimento microbiano no início do processo de fermentação das silagens é crucial para a qualidade das mesmas. A fermentação láctica, promovida pelas bactérias ácido-láticas (BAL), é a grande responsável pela queda rápida do pH, acarretando na inibição dos microrganismos indesejáveis, como clostrídios e enterobactérias (McDONALD et al., 1991)

As alterações ocorridas nos primeiros dias após a ensilagem são críticas para o sucesso da fermentação subsequente. Se as condições são apropriadas, as bactérias lácticas acidificam rapidamente o meio a uma extensão em que os microrganismos indesejáveis não sobrevivem, resultando em uma silagem estável, com baixo pH. Se o pH não é reduzido rapidamente, os microrganismos indesejáveis podem competir pelos nutrientes, reduzindo as chances de obtenção de uma silagem estável. Portanto, a maneira mais efetiva de se inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis é promover a maximização da fermentação láctica (McDONALD et al., 1991). Desse modo, a modulação do crescimento e desenvolvimento de microrganismos tornam-se necessários como forma de elevar ao máximo as fermentações desejáveis, para obtenção de produtos mais estáveis e de melhor qualidade nutricional.

2.6 PRODUÇÃO DE GASES DURANTE A FASE FERMENTATIVA DE SILAGENS

O processo produtivo de gases durante a fase fermentativa da silagem é um parâmetro complementar que permite estimar o padrão fermentativo da massa ensilada. Quanto maior é a atividade de respiração residual das células da planta ensilada, e dos organismos responsáveis pela perda de energia e matéria seca da silagem, maior é a produção de gases.

Além da respiração do oxigênio residual presente nos poros da massa ensilada, a produção de gases é decorrente da fermentação durante o período de armazenamento, intermediada por microrganismos que consomem os carboidratos, ocasionando perdas de MS na forma de CO₂ e diferentes compostos orgânicos voláteis (COV).

Dados de pesquisas realizadas no CPFOR mostram que a maior parte dos gases é formada nos 3 primeiros dias após o fechamento dos silos, e em grande parte são decorrentes da respiração da planta, que utiliza o O₂ residual, e de infiltrações ou proveniente de bactérias anaeróbias, que realizam fermentações indesejáveis, e normalmente crescem em meios com pH mais elevado. Em geral, silagens de milho avaliadas no grupo de pesquisa produzem gases por 14 a 20 dias, com volumes médios entre 12 e 18 L por silo. As perdas por gases estão associadas também ao perfil de fermentação ocorrido na silagem, sendo que as menores perdas são ocasionadas pelas bactérias homofermentativas, que utilizam glicose como substrato para a síntese de lactato, enquanto que, maiores produções de gases estão associadas com as enterobactérias e bactérias heterofermentativas (McDONALD et al. 1991).

A produção de gases em silos experimentais é, comumente, uma variável estimada por variações no peso dos silos experimentais (gravimetria). As equações que têm sido utilizadas incluem os teores de matéria seca como principal variável para a determinação dos seus cálculos

(JOBIM et al., 2007). Não obstante, muitos trabalhos ignoram a necessidade da correção do teor de matéria seca durante a secagem em estufa, já que esse método não é propício para determinação dessa fração em amostras que contêm substâncias voláteis, além da própria água.

Em silagens, grande parte dos produtos de fermentação é perdida a partir da volatilização, a citar, os ácidos orgânicos, etanol, entre outros (COLOVOS et al., 1957; FOX e FENDERSON, 1978, citados por DANIEL, 2011). É importante destacar que a perda de compostos orgânicos voláteis leva consigo moléculas de carbono, que podem subestimar a determinação das perdas gasosas pelos métodos convencionais (JOBIM et al., 2007; DANIEL, 2011, BONIFACIO et al., 2016).

Sendo assim, a melhor forma de avaliar a produção de gases e as perdas por gases durante o processo fermentativo da silagem seria a realização da coleta total de gases produzidos de forma direta. Todavia, até o momento, poucos pesquisadores trabalharam no desenvolvimento de metodologias experimentais que permitam esse tipo de avaliação (SCHMIDT et al., 2012; BUENO et al., 2020). Diante disso, o Centro de Pesquisas em Forragicultura (CPFOR) da Universidade Federal do Paraná, fez uma adaptação de silos experimentais conectando-os a uma câmara de armazenamento que possibilita a mensuração do volume de gás produzido em tempo real, conforme descrito por Souza (2015). O método utilizado para essa avaliação consiste no uso de um dispositivo coletor de gases construído a partir de uma proveta graduada, conectada a uma mangueira de silicone e acoplada a uma torneira de três vias, onde essa proveta é mantida com a abertura voltada para baixo, imersa em água, para evitar o escape de gases.

2.7 ADITIVOS MICROBIANOS

Existem inúmeras substâncias, orgânicas ou inorgânicas, bióticas ou abióticas, que têm sido estudadas com o intuito de modificar o processo fermentativo da silagem para diminuir o máximo possível as perdas (SCHMIDT et al., 2014). Nessa perspectiva, a vasta quantidade de aditivos recomendados para a utilização em silagem tem a finalidade de melhorar o processo de conservação desse volumoso e vários tipos de aditivos podem ser aplicados no início do processo para garantir que a fermentação ocorra de forma adequada e para melhorar a qualidade da silagem (MUCK et al., 2018).

No Brasil, foi estimado que apenas 27,7% dos produtores aplicam aditivos na ensilagem (BERNARDES e REGO, 2014). O uso desses inoculantes é adotado com o objetivo de direcionar a rota fermentativa por uma dessas vias: homolática ou heterolática, a fim de

aumentar a população microbiana para acelerar a queda do pH e conservar a quantidade de nutrientes na forragem (BAYATKOUHSAR et al., 2012), com consequente benefício no desempenho dos animais (KUNG, 2009). Entretanto, é importante salientar que Schmidt et al. (2014) asseguram que a depender das características da forrageira e do manejo adotado, a utilização de inoculantes microbianos pode ser dispensada.

Os aditivos são testados a fim de viabilizar um melhor padrão de fermentação e ajudar na conservação das características nutricionais das silagens produzidas (SCHIMIDT et al., 2007; SÁ NETO et al., 2013). Apesar disso, conforme revisão de Andrade (2000), existe uma disparidade nos resultados disponíveis sobre o efeito de aditivos na ensilagem da planta de milho decorrentes do uso de diferentes variedades, da composição da planta no momento da colheita e pelos diferentes tipos de aditivos utilizados. Em consonância, Kung (2009) afirma que as perdas de MS foram reduzidas com o uso de aditivos em apenas 35% dos estudos e Zopollatto et al. (2009), comparando os resultados do uso de inoculantes microbianos em silagens de milho, sorgo, cana-de-açúcar e gramíneas tropicais no Brasil, constataram que para maior parte das variáveis estudadas a presença de respostas positivas é inferior a 40%. Em revisão que cobre estudos publicados desde 2000 e investigam a eficácia de aditivos para silagem, Muck et al. (2018) mostraram que os inoculantes combinados visam fornecer os benefícios da estabilidade aeróbia e a eficiência da fermentação da silagem para além dos benefícios da produtividade animal. A pesquisa indica que esses produtos estão melhorando a estabilidade aeróbia, mas os estudos de alimentação ainda não são suficientes para tirar conclusões sobre os efeitos no desempenho dos animais.

Aditivos microbianos incluem bactérias heterofermentativas, homofermentativas ou a combinação destas (ZOPOLLATTO et al., 2009). A bactéria *L. buchneri* é uma das mais estudadas entre os microrganismos utilizados como inoculantes biológicos (DRIEHUIS et al. 2001; PEDROSO et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2007; SOUSA et al., 2008; BALIEIRO NETO et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2010; SCHIMIDT et al., 2011). Os principais benefícios da utilização de *L. buchneri* são relacionados à inibição do crescimento e metabolismo da população de leveduras e, consequentemente, menor produção de etanol e maior estabilidade aeróbia das silagens (DRIEHUIS et al., 2001; PEDROSO et al., 2007). De acordo com essa afirmativa, o estudo realizado por Salvo et al. (2013) mostra que a inoculação com *L. buchneri* promoveu alterações no padrão fermentativo e composição química das silagens, notando-se maior perda de matéria seca (MS) 9,21% x 14,01% (controle x com inoculação de *L. buchneri*, respectivamente), que ocorreram sob forma de gases e efluentes no processo de fermentação heterolática, e maior estabilidade em aerobiose 15,50h x 26,91h (controle x com inoculação de

L. buchneri, respectivamente). Por outro lado, bactérias homoláticas, como o *Lactobacillus plantarum*, também são testadas como aditivos microbianos, com o objetivo de reduzir o pH final, aumentar o conteúdo de ácido láctico e diminuir a perda de MS durante a conservação das silagens. Todavia, os efeitos sobre a população de leveduras, produção de etanol e estabilidade aeróbia são variáveis (FREITAS et al., 2006; VALERIANO et al., 2009; MIRANDA et al., 2011).

Avaliando a dinâmica populacional microbiana de forragem de milho tratada ou não com *L. plantarum*, Keshri et al. (2018) perceberam maior teor de ácido láctico na silagem tratada quando comparada com a silagem controle (0,5 pontos percentuais) e maior diversidade microbiana. Os autores mostraram ainda que a deterioração ocorreu mais rápido na silagem aditivada, provavelmente devido a maior quantidade de fungos que assimiladores do ácido láctico. Já Kleinschmidt e Kung (2006) mostraram que com o uso de *L. buchneri* há aumento considerável na estabilidade com pequenas perdas de matéria seca (aproximadamente 1%). No entanto, é importante destacar, que muito mais do que a espécie, a variação entre cepas é gigante, e a seleção de novas cepas têm levado ao surgimento de novos inoculantes comerciais com efetividade superior ao histórico apresentado na literatura. Esse fato permite afirmar que a evolução nessa área é constante e bastante significativa. Dessa forma, a decisão na escolha do inoculante deverá avaliar se a quantidade de perdas de matéria seca irá compensar a maior estabilidade do material.

Segundo Ribeiro et al. (2005), a inabilidade de bactérias ácido lácticas homofermentativas em promover estabilidade aeróbia despertou o interesse da pesquisa pelo uso de bactérias heteroláticas, capazes de produzir ácidos com efeito antifúngico, e ao mesmo tempo estáveis em meio aeróbio. Esses autores relataram a importância da associação entre diferentes bactérias para elaboração de inoculantes, em função do aumento no interesse envolvendo grupos distintos de microrganismos para a melhoria dos processos fermentativos (papel desempenhado pelas bactérias homofermentativas) e no aumento da estabilidade aeróbia (verificada pelo incremento de ácidos produzidos por bactérias heterofermentativas). A junção destes microrganismos tem incitado diversas pesquisas para elucidar a efetividade e o desempenho de seu uso em conjunto. O sucesso do processo de ensilagem está estritamente ligado à premissa de que a silagem deve conter ácido láctico em conjunto com o ácido acético, uma vez que há incertezas ao avaliar os riscos de deterioração aeróbia de acordo com o perfil fermentativo da silagem (AMARAL, 2011; QUEIROZ et al., 2012).

Em estudo sobre influência da inoculação de *L. plantarum* no capim Napier, com ou sem atraso na vedação, Cai et al. (2020) observaram que nos silos vedados imediatamente o *L.*

plantarum foi dominante na população e a qualidade na fermentação foi melhorada. Entretanto, nas silagens com atraso na vedação as bactérias aeróbias e as leveduras foram os micróbios dominantes, e todas as silagens eram de baixa qualidade. Não obstante, é importante destacar que embora os aditivos sejam substâncias adicionadas no momento da ensilagem para obtenção de uma silagem de qualidade, a sua utilização não suprime, em hipótese alguma, os cuidados necessários em todo o processo de ensilagem, uma vez que a qualidade da massa ensilada está relacionada com a qualidade do processo em toda a sua extensão.

2.8 ESTABILIDADE EM AEROBIOSE

O grau de anaerobiose alcançado no momento do fechamento do silo, e a sua sustentação durante o armazenamento da massa ensilada determinam o êxito da silagem produzida, revelando o O₂ como protagonista do processo de deterioração da silagem (ASHBELL e LISKER, 1988). De acordo Pitt (1990), a vida de prateleira da silagem é determinada pela estabilidade aeróbia da massa.

A perda de compostos nutricionais após a abertura dos silos é também um fator incisivo na qualidade nutricional das silagens. A exposição da silagem ao oxigênio após a abertura é inevitável, permitindo o crescimento de microrganismos aeróbios responsáveis pela deterioração do material ensilado (SCHMIDT, 2006). A deterioração aeróbia da silagem é promovida pela ação de microrganismos que degradam o ácido láctico, causando a elevação do pH da silagem e permitindo o crescimento de outros microrganismos indesejáveis (McDONALD et al., 1991). O crescimento da população de leveduras e seu metabolismo aeróbio é a principal causa do início dessa deterioração (RANJIT et al., 2000).

É importante destacar que o período após a abertura do silo trata-se de uma fase crítica em todo o processo de ensilagem. Os nutrientes conservados e/ou produzidos durante a fermentação pela presença de bactérias homoláticas (ácido láctico) podem ser consumidos quando o silo entra em contato com o oxigênio (MUCK, 2004). No entanto, todas as etapas do processo de ensilagem precisam ser seguidas rigorosamente, uma vez que isso influenciará diretamente no momento de exposição do material pós abertura. Nessa perspectiva, Cai et al. (2020) demonstraram que bactérias aeróbias, e a contagem de leveduras e bolores, cresceram vigorosamente na forragem exposta ao ar antes da ensilagem e aumentaram durante a ensilagem e exposição aeróbia, causando perdas por deterioração. Brüning et al. (2018) também constataram que o atraso na vedação dos silos diminuiu a estabilidade aeróbia das silagens de milho; as silagens que foram vedadas quatro ou dois dias após o enchimento apresentaram

menor estabilidade aeróbia do que as silagens vedadas imediatamente (49, 52 e 64 horas, respectivamente).

A estabilidade da silagem é determinada pela resistência à oxidação de substrato que ocorre após a abertura do silo. Portanto, a concentração de oxigênio e a profundidade que o ar penetra no silo são fatores preponderantes (JOBIM, 2007).

O desenvolvimento dos microrganismos aeróbios pode ser monitorado pela elevação na temperatura da massa, e esse processo de deterioração da silagem exposta ao ar, causado pela ação de microrganismos aeróbios tem como resultado a produção de CO₂, que também pode ser considerada uma medida para a avaliação das perdas de matéria seca (Schmidt et al. 2010).

De acordo com Kung et al. (2000), a quebra da estabilidade aeróbia consiste no tempo necessário para que a temperatura da silagem exceda a temperatura ambiente em 2 °C, ou seja, representa a resistência da silagem ao aquecimento. Entretanto, alguns pesquisadores têm estimado a estabilidade aeróbia como sendo o tempo para elevação da temperatura da silagem em 1 °C acima da temperatura ambiente, conforme definido por Driehuis et al. (2001).

A temperatura da silagem aumenta devido à atividade dos microrganismos aeróbios e o seu valor nutritivo pode diminuir em até 16% em relação à silagem na abertura do silo, antes dos fungos começarem a ser aparentes. Esta diminuição do valor nutritivo pode estar associada especialmente ao esgotamento de produtos finais da fermentação e oxidação de carboidratos solúveis, que se tornam disponíveis progressivamente a partir da degradação do amido e da hemicelulose (TABACCO et al., 2011). O consumo destes compostos orgânicos e de outros nutrientes solúveis resulta em perdas de matéria seca, possível produção de micotoxinas, crescimento de espécies patogênicas e produção de calor (FILYA e SUCU, 2007). A estabilidade aeróbia é de fundamental importância em termos qualitativos, pois certifica que os nutrientes do material estejam conservados, evitando-se ação de microrganismos que sejam indesejáveis ao processo (YUAN et al., 2015).

Diante do exposto, pode-se afirmar que o tempo decorrido entre a colheita e a ensilagem em uma rotina experimental é uma importante variável, que pode influenciar tanto a composição quanto as perdas fermentativas e estabilidade das silagens. O estudo do efeito dessa variável permitirá a elaboração de um protocolo experimental que viabilize comparações mais precisas entre tratamentos em experimentos com silagens, para serem usadas nos ensaios futuros.

REFERÊNCIAS

- ASHBELL, G.; LISKER, N. Aerobic deterioration in maize silage stored in a bunker silo under farm conditions in a subtropical climate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.45, p. 307-315, 1988.
- AMARAL, R.C. Estratégias de controle da deterioração aeróbia em silagem de milho e seu valor alimentício para vacas em lactação. Piracicaba: USP, 2011. 173 p. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2011.
- ANDRADE, S.T.J. Avaliação de inoculantes biológicos na ensilagem de milho, sorgo, capim elefante e alfafa. Botucatu: UNESP, 2000. 114 p. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Botucatu, 2000.
- BALIEIRO NETO, G. et al. Perdas fermentativas, composição química, estabilidade aeróbia e digestibilidade aparente de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químico e microbiano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 6, p. 621-630, 2009.
- BAYATKOUHSAR, J. et al. Effects of microbial inoculant on composition, aerobic stability, in situ ruminal degradability and in vitro gas production of corn silage. **International Journal of AgriScience**, v. 2, n. 9, p. 774-786, 2012.
- BERNARDES, T. F. et al. Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. *Journal of dairy science*, v. 101, n. 5, p. 4001-4019, 2018.
- BERNARDES, T. F.; DO RÊGO, A. C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1852-1861, 2014.
- BONIFACIO, H. F. et al. A process-based emission model of volatile organic compounds from silage sources on farms. **Atmospheric Environment**, v. 152, p. 85-97, 2017.
- BRÜNING, D. et al. Effect of compaction, delayed sealing and aerobic exposure on maize silage quality and on formation of volatile organic compounds. **Grass and Forage Science**, v. 73, n. 1, p. 53-66, 2018.
- BUENO, A. V. I. et al. Natamycin as a potential silage additive: A lab trial using sugarcane to assess greenhouse gas emissions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 49, 2020.
- CAI, Y. et al. Influence of microbial additive on microbial populations, ensiling characteristics, and spoilage loss of delayed sealing silage of Napier grass. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 33, n. 7, p. 1103, 2020.
- CHERNEY, J.H.; CHERNEY, D.J.R. Assessing Silage Quality. In: Buxton et al. **Silage Science and Technology**. Madison, Wisconsin, USA. 2003. p.141-198.
- COLLINS, M.; OWENS V.N. Preservation of Forage as Hay and Silage. In: BARNES, R., et al. **Forages: An Introduction to Grassland Agriculture**. v. 1. 6. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2003. Cap. 19, p. 443– 471.

- DANIEL, J.L.P. Contribuição da fração volátil no valor nutricional de silagens. 160p. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.
- DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v. 56, n. 4, p. 330-343, 2001.
- FACTORI, M. Degradabilidade ruminal de híbridos de milho em função do estágio de colheita e processamento na ensilagem. 2008. 75f. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu-SP, 2008.
- FANCELLI, A. L. Fisiologia, nutrição e adubação do milho para alto rendimento. **Simpósio sobre rotação soja/milho no plantio direto**, v. 1, 2000.
- FERRARETTO, L.F.; SHAVER, R.D.; LUCK, B.D. Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. **Journal of Dairy Science**, v.101, n.5, p. 3937-3951, 2017.
- FERREIRA, J. J. Características qualitativas e produtivas da planta de milho e sorgo para silagem. **Produção e utilização de silagem de milho e sorgo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo**, p. 383-404, 2001.
- FILYA, I.; SUCU, E. The effect of bacterial inoculants and a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of whole-crop cereal silages. **Asian-australasian journal of animal sciences**, v. 20, n. 3, p. 378-384, 2007.
- FREITAS, A.W.P. et al. Avaliação da qualidade nutricional da silagem de cana-de-açúcar com aditivos microbianos e enriquecida com resíduo da colheita de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.1, p.38-47, 2006.
- HARGREAVES, A.B.; BUTENDIECK, B.N.; HIRIRART, L.M. Comparacion de dos silos experimentales para la investigacion de ensilajes. **Agricultura técnica**, v.45, p.185-191, 1986.
- HENRIQUE, W.; ANDRADE, J. B.; SAMPAIO, A. A. M. Silagem de milho, sorgo, girassol e suas consorciações. II. Composição bromatológica. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 379-381, 1998.
- JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G. Princípios básicos da fermentação na ensilagem. **Forragicultura–Ciência, tecnologia e gestão de recursos forrageiros. Jaboticabal: Editora FUNEP**, 2013.
- JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G.; REIS, R. A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade de forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 101-119, 2007.
- JUNGES, D. Aditivo microbiano na silagem de milho em diferentes tempos de armazenamento e avaliação da estabilidade aeróbia por termografia em infravermelho.

Dissertação (Mestrado em zootecnia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2010.

KESHRI, J. et al. Microbiome dynamics during ensiling of corn with and without *Lactobacillus plantarum* inoculant. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 9, p. 4025-4037, 2018.

KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG JR, L. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. **Journal of dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 4005-4013, 2006.

KUNG JR, L. et al. Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 7, p. 1479-1486, 2000.

KUNG JR., L. Side effects of microbial inoculants on silage fermentation In: **International Symposium on Forage Quality and Conservation**, São Pedro. Proceedings... Piracicaba: FEALQ, 2009. p.7-26, 2009.

LIN, C. et al. Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2484-2493, 1992.

MCDONALD, P.N., HENDERSON, N., HERON, S. **The Biochemistry of Silage**, second ed. Chalcombe Publications, UK, 1991.

MILLS, J. A.; KUNG, L. JR. The effect of delayed ensiling and application of a propionic acid-based additive on the fermentation of bar-lely silage. **Journal of Dairy Science**, 85, 1969–1975, 2002.

MIRANDA, D.C.L. Composição e pH de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químicos e microbiológicos. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 54, n. 2, p. 122-130, 2011.

MUCK, R.E. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. In: **ASAE Annual Meeting. American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 47, p. 1011 – 1016, 2004.

MUCK, R. E. Factors influencing silage quality and their implications for management. **Journal of Dairy Science**. v. 71, n. 11, p. 2992– 3002, 1988.

MUCK, R. E. et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 3980-4000, 2018.

MUCK, R. E.; PITT, R. E. Ensiling and its effect on crop quality. In: **Proc. Natl. Silage Prod. Conf., Syracuse, NY. NRAES-67. Northeast Reg. Agric. Ext. Serv., Ithaca, NY.** 1993. p. 57-66.

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, (supl. especial), p. 183-191, 2010.

NEUMANN, M. et al. Efeito do tamanho de partícula e da altura de colheita das plantas de milho (*Zea mays* L.) sobre as perdas durante o processo fermentativo e o período de utilização das silagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1395-1405, 2007.

NUSSIO, L.G. et al. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. In: **SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS**, Maringá. Anais... Maringá: UEM/CCA/DZO, p.127-145, 2001.

PAHLOW, G. et al. **Silage science and technology**, Madison, Wisconsin, USA. 2003.

PEDROSO, A.F. et al. Efeito do tratamento com aditivos químicos e inoculantes bacterianos nas perdas e na qualidade de silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.558-564, 2007.

PEDROSO, A. F. Silagem: princípios básicos, produção e manejo. In: **CURSO: PRODUÇÃO E MANEJO DE SILAGEM**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 1998. p. 11- 40.

PEREIRA, O. G. et al. Produção e utilização de forragens conservadas. **Semana de Zootecnia**, Diamantina. v. 2, p. 75-118b, 2004.

PEIXOTO, C.P. et al. **Princípios de fisiologia vegetal: teoria e prática**. - 1. ed. - Rio de Janeiro, 2020. p 138-139.

PITT, R.E. Silage and hay preservation. Ithaca: **Northeast Regional Agricultural Engineering Service**, 53p. (NRAES-5), 1990.

QUEIROZ, O.C.M. et al. Effect of a dual-purpose inoculant on the quality and nutrient losses from corn silage produced in farm scale silos. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 3354-3362, 2012.

RANJIT, N. T.; KUNG, L., JR. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservation on fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p.526-535, 2000.

RESTLE, J. et al. Manipulação da altura de corte da planta de milho (*Zea mays*, L.) para ensilagem visando a produção do novilho super precoce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1235-1244, 2002.

RIBEIRO, J. L. et al. Desenvolvimento de aditivos microbianos para ensilagem: realidade e perspectivas. **Volumosos na produção de ruminantes. Jaboticabal: Funep**, p. 1-23, 2005.

RODRIGUES, P.H.M. et al. Estudo comparativo de diferentes tipos de silos sobre a composição bromatológica e perfil fermentativo da silagem de milho. **Acta Scientiarum**, v.24, n.4, p.1127-1132, 2002.

ROTZ, C. A.; MUCK, R. E. Changes in forage quality during harvest and storage. **Forage quality, evaluation, and utilization**, p. 828-868, 1994.

SALVO, P. A. R. et al. Características de silagens de milho inoculadas com *Lactobacillus buchneri* e *L. plantarum*. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, n. 239, p. 379-390, 2013.

SÁ NETO, A. et al. Silagem de milho ou de cana-de-açúcar com *Lactobacillus buchneri* exclusivamente ou em associação com *L. plantarum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 528-535, 2013.

SCHMIDT, P. et al. Aerobic stability evaluation by carbon dioxide (CO₂) production on corn silages using Infrared Gas Analyzer. **23rd General Meeting of the European Grassland Federation**. Grassland in a Changing World. Germany, Kiel. August 29th - September 2nd, 2010.

SCHMIDT, P. et al. Greenhouse gas emissions from fermentation of corn silage. **Proceedings of the XVI International Silage Conference**, Hämeenlinna, Finland, p. 448, 2012.

SCHMIDT, P. Perdas fermentativas na ensilagem, parâmetros digestivos e desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar. Piracicaba. Universidade de São Paulo, 2006. 228p. **Tese** (Doutorado em Agronomia). USP. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2006.

SCHMIDT, P. et al. Novos aditivos microbianos na ensilagem da cana-de-açúcar: composição bromatológica, perdas fermentativas, componentes voláteis e estabilidade aeróbia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 543-549, 2011.

SCHMIDT, P. et al. Uso estratégico de aditivos em silagens: Quando e como usar. **Simpósio: produção e utilização de forragens conservadas**, v. 5, p. 243-264, 2014.

SIQUEIRA, G. R. et al. Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 2000-2009, 2007.

SIQUEIRA, G. R. et al. Queima e aditivos químicos e bacterianos na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 1, p. 103-112, 2010.

SOUSA, D. P. et al. Efeito de aditivo químico e inoculantes microbianos na fermentação e no controle da produção de álcool em silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 9, p. 1564-1572, 2008.

SOUZA, C.M. Impacto ambiental da produção de silagens: revisão da literatura e avaliação experimental em silos laboratoriais. 2015. 131p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TABACCO, E. et al. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different acid bacteria inocula. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.1409-1418, 2011.

TOMICH, T.R. et al. 2003. Características químicas para avaliação do processo fermentativo de silagens: uma proposta para qualificação da fermentação. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, 2003.

VALERIANO, A.R. et al. Efeito da adição de *Lactobacillus* sp. Na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.6, p.1009-1017, 2009.

VELHO, J. P. et al. Alterações bromatológicas nas frações dos carboidratos de silagens de milho "safrinha" sob diferentes tempos de exposição ao ar antes da ensilagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, supl. p. 1621-1628, 2006.

WEISS, K. et al. Effects of air exposure, temperature and additives on fermentation characteristics, yeast count, aerobic stability and volatile organic compounds in corn silage. **Journal of Dairy Science**, 99, 8053–8069, 2016.

WILLS, R. H.; LEE, T. H.; HALL, E. G. **Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruits and vegetables**. Westport: AVI, 160 p. 1998.

YUAN, X. J. et al. The effect of different additives on the fermentation quality, in vitro digestibility and aerobic stability of a total mixed ration silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 207, p. 41-50, 2015.

ZOPOLLATTO, M. et al. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.38, p.170-189, 2009.

ZOPOLLATO, M.; SARTURI, J.O. Optimization of the animal production system based on the selection of corn cultivars for silage. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION**, São Pedro, 2009. Proceedings... Piracicaba: FEALQ, 2009. p.73-90.

3 CAPÍTULO II – PERDAS FERMENTATIVAS, MICROBIOLOGIA E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE MILHO ENSILADAS EM 4 TEMPOS DIFERENTES COM USO OU NÃO DE INOCULANTE MICROBIANO

3.1 INTRODUÇÃO

Ensaio experimentais para avaliação de parâmetros referentes ao processo de ensilagem são muito comuns. Em geral, esses ensaios são realizados em pequenas unidades, comumente chamadas de silos experimentais. Nessas unidades são avaliadas as respostas relativas à aplicação de aditivos e diversas variáveis qualitativas. Apesar da importância e abundância dessas pesquisas, as metodologias usadas nos trabalhos são muito diversas, e importantes variáveis que podem afetar os resultados das pesquisas muitas vezes são negligenciadas ou não são descritas corretamente nos artigos.

O uso de silos experimentais para pesquisas com silagens é prática corriqueira, embora não exista nenhuma padronização sobre esses equipamentos (JOBIM et al., 2007), uma vez que oferece maior facilidade de manuseio e possibilita o máximo controle dos fatores que interferem nos processos fermentativos, com a vantagem da utilização de menor volume de material ensilado, que permite redução de custos, e maior número de repetições (PERKINS e PRATT, 1951).

É importante destacar que os processos de conservação de forragens sempre geram redução dos nutrientes em diversas magnitudes. As perdas na produção de silagem e as suas consequências sobre a eficiência na preservação do alimento demonstram a importância no seu detalhamento em todas as etapas do processo.

As plantas após o corte continuam a respirar, o oxigênio é absorvido e, durante o metabolismo, os carboidratos são convertidos em gás carbônico, água e calor, havendo perda de matéria seca e, conseqüentemente, perdas nutricionais. Sendo assim, a ordem de ensilagem durante os tratamentos pode influenciar significativamente as variáveis estudadas, uma vez que as plantas são colhidas em um só momento e a partir destas são retirados montantes para a condução dos tratamentos.

As etapas de enchimento e compactação estão estritamente ligadas às condições de aerobiose dentro do silo, pois tem como objetivo eliminar o ar remanescente no interior da massa, criando um ambiente anaeróbio propício para o começo da fermentação desejada. Por isso, o rápido fechamento do silo, associado a uma boa compactação, é responsável pela

diminuição do oxigênio na massa ensilada, redução do processo respiratório, e maximização da fermentação. A eficiência na remoção do ar é fator-chave para a produção de uma boa silagem.

Entretanto, de maneira geral, a avaliação dos tratamentos nos experimentos realizados é feita de forma aleatória, sem levar em consideração a ordem de ensilagem e as consequências da influência do tempo de exposição do material antes da ensilagem (NOVINSKI, 2018). Da mesma forma, a comparação de resultados experimentais que desconsideram o tempo de exposição ao ar antes da ensilagem é questionável. Diante disso, fica evidente a necessidade de se estabelecer metodologia específica e criteriosa para realização de ensaios.

Nessa perspectiva, acreditamos que a exposição aeróbia da forragem picada antes da ensilagem deve ser a menor possível, para minimizar as perdas do valor nutricional do alimento. Assim sendo, objetiva-se avaliar o efeito do tempo de ensilagem sobre as respostas do uso de aditivos em ensaios experimentais em silagem de milho. Pretende-se quantificar a variabilidade nos resultados experimentais em função de diferentes tempos decorridos entre o corte e picagem da planta, e a vedação dos silos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local

O experimento foi realizado no Centro de Pesquisas em Forragicultura (CPFOR) da Universidade Federal do Paraná, localizado na Fazenda Canguiri - UFPR, situada no município de Pinhais, PR, com altitude de 950 m.

O clima da região é classificado pelo método de Köppen como Cfb, isto é, mesotérmico (subtropical e temperado), sempre úmido (sem estação seca definida), com verões amenos e geadas severas e frequentes.

3.2.1.1 Condições climáticas durante o a condução da cultura

As variáveis climáticas do período de condução da cultura estão apresentadas na FIGURA 1.

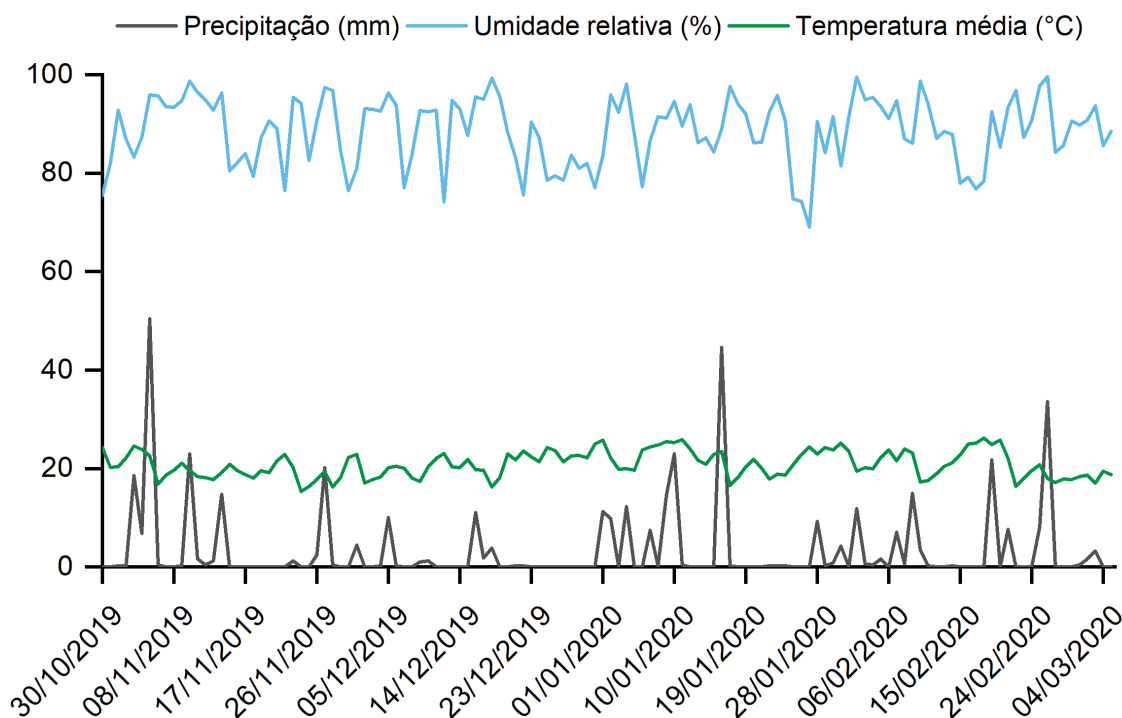


FIGURA 1 – PRECIPITAÇÃO, UMIDADE RELATIVA DO AR E TEMPERATURA MÉDIA DO PERÍODO DO PLANTIO ATÉ A COLHEITA DO MILHO

FONTE: Simepar (2020).

As médias das temperaturas ocorridas nos meses de outubro a março da safra 2019/2020 variaram de 26,2 °C (máxima) a 15,2 °C (mínima). No início da implantação da cultura (outubro) a temperatura média foi 24,2 °C e no momento da colheita da silagem (março) a temperatura média foi 18,8 °C. A precipitação pluviométrica variou entre 50,4 mm (máximo) a 0 mm (mínimo), com precipitações consideradas baixas em quase todo o período experimental, com umidade relativa variando entre 69,1% e 99,6% (FIGURA 1).

3.2.2 Implantação da cultura e tratos culturais

A espécie cultivada foi o milho (*Zea mays*), híbrido da *Pioneer P4285VYHR*®, numa área de 120 m². A semeadura foi realizada em 30 outubro de 2019, utilizando-se espaçamento entre linhas de 0,5 m, com profundidade de semeadura de 4 cm e distribuição de 4 sementes por metro linear, a fim de obter população final de 80 mil plantas/ha.

Para as recomendações de adubação na semeadura e cobertura foi utilizado o Manual de Adubação e Calagem do Estado do Paraná (PAULETTI; MOTTA, 2017), baseando-se na análise de solo e na produtividade esperada da cultura.

Para suprir as necessidades nutricionais da planta utilizou-se 650 kg por hectare de adubo formulado NPK 8-20-20, e para atingir a demanda de nitrogênio e potássio necessária, na cobertura utilizou-se 288 kg por hectare de ureia (45%) e 250 kg por hectare de cloreto de potássio (KCl). Ademais, na área implantada foi realizada a gradagem e calagem, uma vez que o milho responde melhor em solos fracamente ácidos ou neutros.

Foram realizadas capinas manuais para retirada de plantas daninhas, especialmente nos estádios iniciais do desenvolvimento da cultura. Por se tratar de área de proteção ambiental, não foram sobrepostos inseticidas, herbicidas ou fungicidas.

3.2.3 Tratamentos

O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x2, resultando em oito tratamentos com 5 repetições. Foram avaliados quatro tempos decorridos entre a picagem das plantas e a vedação dos silos, bem como o uso (ou não) de inoculante bacteriano comercial.

Todos os intervalos de tempo entre o corte das plantas e o fechamento dos silos foram rigorosamente controlados (TABELA 1), sendo os tempos entre a picagem das plantas e o enchimento dos silos de: 30 minutos, 90 minutos, 150 minutos e 210 minutos. Em cada tempo de ensilagem foram testados dois tratamentos: Controle (sem aditivos) e o Inoculante comercial (*Pionner*® 11C33 - *Lactobacillus buchneri* e *L. plantarum*).

TABELA 1 – INTERVALOS DE TEMPO ENTRE AS ETAPAS DO PROCESSO DE ENSILAGEM

Atividade	Horário inicial	Horário final
Corte	08h47min	08h54min
Transporte	08h54min	09h11min
Picagem	09h11min	09h26min
Ensilagem 30'	09h56min	10h24min
Ensilagem 90'	10h56min	11h24min
Ensilagem 150'	11h56min	12h24min
Ensilagem 210'	12h56min	13h24min

3.2.4 Ensilagem do milho

As plantas de milho foram cortadas manualmente e transportadas imediatamente ao CPFOR para picagem em picadora estacionária (Menta, modelo Super 15 T) regulada para o processamento teórico de partículas de 10 mm.

Em cada tempo de ensilagem duas pilhas de 35 kg de forragem picada foram pesadas e alocadas sobre lonas plásticas, previamente higienizadas e distantes 4 metros uma da outra, para montagem dos tratamentos (silagem controle ou inoculada).

O inoculante foi pesado e diluído em água deionizada (2 L/t), conforme a recomendação do fabricante, objetivando a dose de $1,1 \times 10^5$ UFC/g de forragem. A silagem controle recebeu a mesma quantidade de água deionizada (2 L/t).

Para garantir efetividade de execução dos tempos pré-programados de ensilagem e evitar riscos de contaminação cruzada, 10 pessoas previamente treinadas trabalharam simultaneamente, divididas em duas equipes diferentes (controle e inoculante), durante toda a montagem do ensaio.

Quarenta silos de policloreto de vinila (PVC) de 8,8 L foram utilizados como silos experimentais. Os silos possuíam grades plásticas no fundo para retenção de efluente, cobertas com pano de algodão e tela.

Após a aplicação dos tratamentos, a forragem homogeneizada foi individualmente pesada para a compactação manual nos silos experimentais. Em seguida, os silos foram fechados e hermeticamente vedados com selante líquido (Selabond®). Os silos foram imediatamente acoplados a um sistema para coleta e mensuração de gases (FIGURA 2), conforme descrito por Bueno et al. (2020), e armazenados em temperatura ambiente por 55 dias.

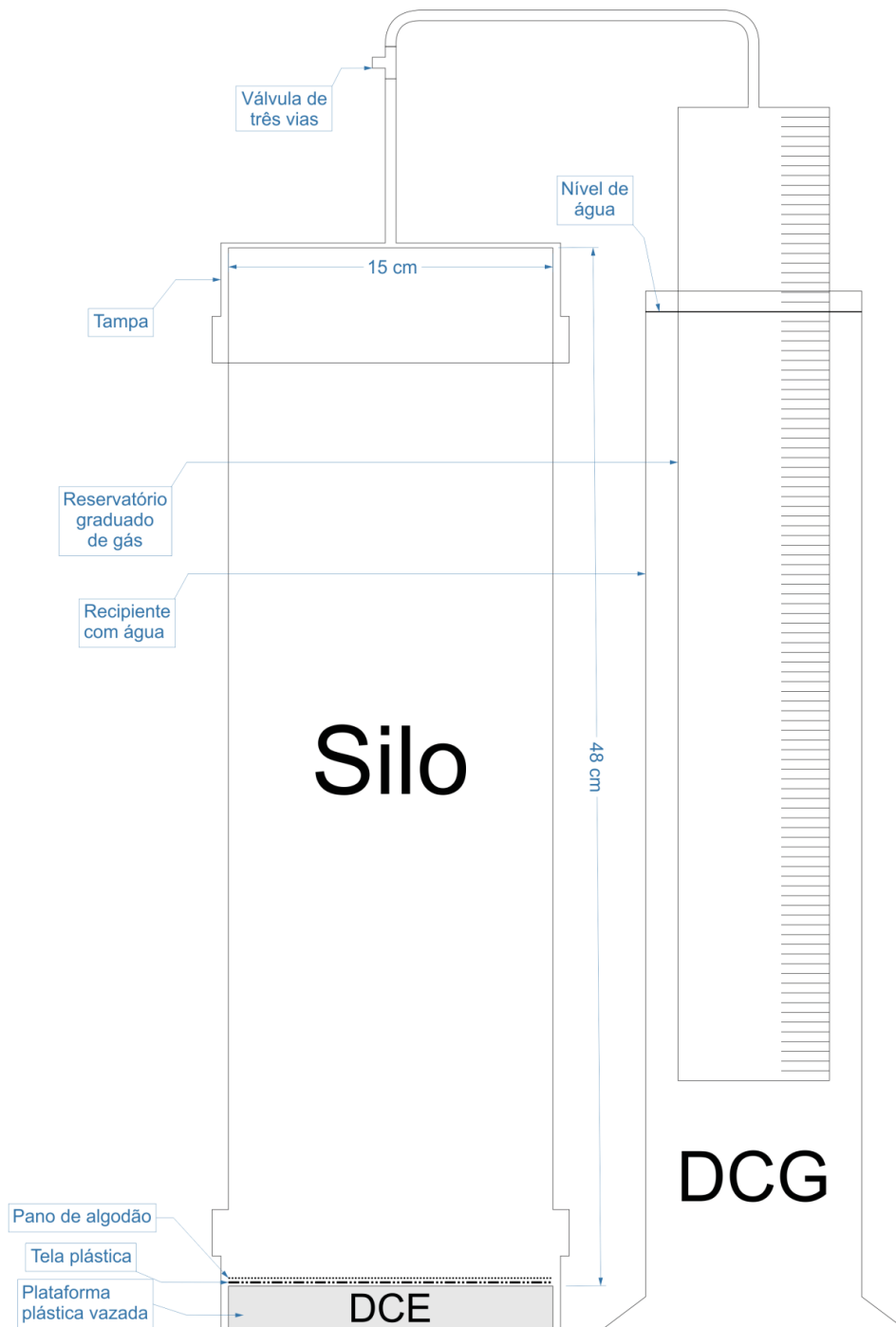


FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA COMPOSTO POR DISPOSITIVO COLETOR DE GÁS (GCD) E EFLUENTE (ECD)

FONTE: Souza et al. (2015).

3.2.5 Avaliação da produção de gases

Para a avaliação da produção de gases durante o processo fermentativo da massa ensilada os silos experimentais foram equipados de acordo com a metodologia descrita por Souza (2015) e Bueno et al. (2020).

Toda produção de gases foi monitorada e registrada até que fosse totalmente cessada (8 d), à temperatura ambiente média de $22,7 \pm 1,0$ °C. O intervalo entre uma leitura e outra foi determinado conforme a velocidade de produção dos gases, já que o sistema desenvolvido apresenta capacidade de armazenamento para apenas 1 litro, o que torna imprescindível o esvaziamento frequente para que não haja vazamento e perda dos gases. O esvaziamento do reservatório, sem a entrada de ar atmosférico nos silos, foi realizado através da torneira de três vias. A produção total de gás no período de armazenamento foi expressa em L de gás por kg de MS ensilada.

3.2.6 Abertura dos silos experimentais

Transcorridos os 55 dias após a ensilagem, os silos foram abertos para as coletas de amostras para as posteriores análises de teor de MS, pH, contagens microbiológicas, composição bromatológica, COV, e montagem de ensaio para avaliação da estabilidade em aerobiose e curva de pH durante o período de exposição ao ar.

3.2.7 Amostragens

As amostras para análise foram coletadas em dois diferentes momentos, o primeiro no momento da ensilagem e o segundo na abertura dos silos.

3.2.7.1 Coleta de amostras na ensilagem

Na ensilagem foram coletadas amostras da planta de milho picada nos 4 tempos avaliados. As amostragens foram realizadas em diferentes pontos dos montes de forragem. Amostras em duplicata de 300 g foram acondicionadas em sacos de papel kraft e alocadas em estufa de ventilação forçada a 65 °C por 72 horas, para a avaliação da MS. Para a avaliação do pH e da microbiologia mais duas amostras de 50 g foram coletadas. A composição químico-bromatológica da forragem está apresentada na TABELA 2.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DA PLANTA DE MILHO ANTES DA ENSILAGEM NOS QUATRO TEMPOS AVALIADOS (30 A 210 MINUTOS)

Variável ¹	Tratamento				Média
	30'	90'	150'	210'	
pH	5,85	5,95	5,87	5,85	5,88
MS (%)	29,3	29,5	29,1	29,1	29,3
FDN (%)	55,0	50,3	48,6	52,7	51,6
FDA (%)	32	28,5	28,21	30,9	29,9
Amido (%)	19,7	24,7	23,6	19,8	22,0
PB (%)	6,91	7,47	7,9	7,19	7,37
Cinzas (%)	2,88	2,62	2,98	2,99	2,87
Extrato Etéreo (%)	2,4	2,73	2,69	2,43	2,56
Lignina (%)	5,09	4,54	4,53	5,04	4,80
CS (%)	14,5	14,3	14,3	15,4	14,6
	Log UFC/g				
BAL	-	-	5,30	5,60	5,45
Leveduras	6,40	6,53	6,40	5,95	6,32
Bolores	5,30	5,60	5,60	5,60	5,53

¹ Matéria seca a 65 °C.

3.2.7.2 Coletas de amostras na abertura dos silos experimentais

Para a realização da coleta das amostras dos silos experimentais toda a silagem armazenada nos silos foi retirada e homogeneizada em sacos plásticos. Na sequência, duas amostras de aproximadamente 300 g foram acondicionadas em saco de papel kraft para secagem em estufa de ventilação forçada a 65 °C por 72 horas. Outra alíquota, de aproximadamente 200 g, foi acondicionada em saco plástico e armazenada em congelador a temperatura de -20 °C, para uso do extrato aquoso da silagem, para análise dos compostos orgânicos voláteis. Outras duas amostras, de aproximadamente 50 g, foram coletadas para análises de pH e microbiologia. Por fim, parte do material foi destinado à avaliação de estabilidade aeróbia.

3.2.8 Análises

Os silos experimentais foram pesados, antes e após a retirada da silagem, para determinação gravimétrica das perdas (JOBIM et al., 2007).

Para as análises de composição química, amostras de aproximadamente 300 g da porção total da silagem e da planta de milho picada fresca, foram coletadas em duplicata e de cada repetição. Foram determinadas as seguintes variáveis: o potencial hidrogeniônico (pH) em extrato aquoso da silagem (KUNG Jr. et al., 1984), em pHmetro digital; a determinação do teor

de matéria seca (MS) em estufa de ventilação forçada, com a temperatura de 65 °C, por aproximadamente 72 horas e em seguida as amostras foram pesadas e posteriormente moídas, para as estimativas das variáveis bromatológicas.

As amostras moídas contra peneira de malha 1 mm foram encaminhadas para o Laboratório 3RLAB, em Chapecó – SC, onde foram colocadas em cubetas próprias do equipamento e escaneadas em Espectrômetro de Reflectância Infravermelho Próximo (NIRS) NIR, modelo DS2500. Após a leitura de cada amostra foi feita a limpeza das cubetas para retirada de resíduos. Para obtenção dos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) (%MS), proteína solúvel (%PB), cinzas, fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), lignina, amido e extrato etéreo (EE), foram utilizados os modelos do próprio equipamento NIRS, utilizando curva de calibração de domínio *Rock River Laboratory* dos EUA. Os resultados foram lidos diretamente na tela do equipamento. A tomada de decisão pela análise via NIRS deu-se em função da confiabilidade obtida para amostras de silagem de milho no referido laboratório, e do impedimento em acessar laboratórios de bromatologia convencional por restrições decorrentes da pandemia de COVID-19.

A avaliação dos ácidos graxos voláteis (AGV) foi realizada no Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ) da Universidade Federal do Paraná. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando cromatógrafo da marca Shimadzu (Kyoto, Japão) e coluna cromatográfica da marca Phenomenex, do tipo Rezex, que operou a 65 °C, utilizando como fase móvel H₂SO₄ 5 mmol/L na vazão de 0,6 mL/min. Os AGV também foram analisados via NIRS, para que pudesse ser feito uma correlação entre as duas análises, com objetivo de determinar qual a intensidade da relação entre elas.

A determinação do teor de carboidratos solúveis (CS) da forragem antes da ensilagem foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pelo método do etanol (80%), adaptado de Hall (1990).

A avaliação de estabilidade aeróbia foi realizada segundo a metodologia descrita por Kung et al. (2000), na qual uma amostra de 3 kg de cada tratamento foi colocada em baldes plásticos abertos e sem compactação. As medidas de temperatura nos silos e do ambiente foram registradas durante 9 dias, com intervalos de 5 minutos, com auxílio de data loggers (Lascar Electronics/UK, modelo EL-USB-1), inseridos no centro geométrico da massa em cada balde. A quebra de estabilidade aeróbia foi considerada como a elevação da temperatura da silagem em 2 °C em relação à temperatura ambiente. Cerca de 700 g de cada silagem foram acondicionados em outro recipiente plástico para amostragem e determinação do pH ao longo do período de exposição aeróbia. Estes recipientes foram mantidos na mesma sala, em temperatura controlada

(23 ± 1 °C). O pH foi determinado nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 após abertura. Também foram coletadas amostras das silagens no início e no término do período de avaliação da EA, para determinação do teor de MS em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C por 72 horas, e estimativa das perdas de MS durante exposição aeróbia (PMSea).

O plaqueamento para contagem de bactérias ácido lácticas, leveduras e fungos filamentosos foi realizado na forragem fresca no dia da ensilagem, e nas silagens no dia da abertura dos silos experimentais, no laboratório do CPFOR.

Para contagem microbiológica, os extratos foram preparados pela adição de 25 g de silagem a 225 mL de solução salina estéril, em saco plástico para homogeneização em homogeneizador de amostras tipo Stomacher (MA440/CF, Marconi, Brasil), onde as amostras foram homogeneizadas por 4 minutos, à velocidade de 150 rpm.

Ao final da agitação a solução foi filtrada em três camadas de gaze e a partir do extrato, foram realizadas diluições sequenciais em caldo MRS (MRS Broth ACC – Rogosa e Sharpe, Merck, Alemanha) para contagem de BAL, e solução salina para contagem de leveduras e bolores.

As diluições (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) em caldo MRS foram plaqueadas em placas Petrifilm (AC, 3M®) e alocadas em jarra de cultivo de microrganismos. A jarra foi mantida sob anaerobiose em estufa a temperatura constante de 30 °C e a contagem da população de BAL foi realizada 48±4 horas após a incubação. As diluições (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) em solução salina foram plaqueadas em placas Petrifilm (YM, 3M®) e incubadas em estufa de cultura (MA415/mini, Marconi, Brasil) com temperatura constante de 23,5 °C por 72 horas, para contagem de leveduras, e 120 horas, para contagem de bolores. É importante destacar aqui que a contagem de BAL, para o tratamento inoculado no tempo 210' foi impossibilitada devido ao escurecimento do caldo MRS utilizado, fazendo com que não houvesse possibilidade de contagem das colônias formadas nessas placas.

3.2.9 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 2, totalizando 40 unidades experimentais (5 repetições/ tempo/aditivo).

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SAS University Edition (2019), os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade, e quando houve significância pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição bromatológica e os produtos da fermentação das silagens de milho avaliadas nos quatro tempos de ensilagem estão apresentados na TABELA 3. O teor de cinzas das silagens foi influenciado apenas pela inclusão do inoculante. Os teores mais elevados desse componente na silagem aditivada possivelmente estejam relacionados ao consumo de parte dos componentes solúveis no metabolismo das bactérias inoculadas, acarretando a elevação dos componentes insolúveis.

Pela análise dos efeitos do tempo de exposição ao ar antes da ensilagem em ambos os tratamentos (aditivo x controle), verifica-se que a permanência da forragem fresca ao ar antes da compactação foi maléfica e elevou a concentração relativa de parede celular, incrementando os teores lignina. A elevação dos teores dessa fração em silagens expostas ao ar é devido ao consumo de compostos mais digestíveis pela ação de microrganismos que oxidam os compostos prontamente solúveis e conseqüentemente eleva a concentração dos componentes da parede celular.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA E PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO DAS SILAGENS DE MILHO EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS) INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer IIC33*

Variável	Tempo				Aditivo		Efeitos ³			
	30'	90'	150'	210'	Controle	Pioneer IIC33	Média	EPM ²	T	A
Cinzas (% MS)	3,02	3,17	3,13	3,11	3,22 ^a	3,01 ^b	3,11	0,05	0,6546	0,0336
Lignina (%)	3,88 ^c	4,04 ^{bc}	4,09 ^{ab}	4,26 ^a	4,02	4,09	4,05	0,03	0,0001	0,4540
Ác. Lático (% MS)	8,98 ^a	8,76 ^a	8,29 ^{ab}	7,53 ^b	8,78 ^a	8,13 ^b	8,43	0,16	0,0046	0,0615
Ác. Acético (% MS)	2,15	2,09	2,03	2,00	1,60 ^b	2,49 ^a	2,07	0,09	0,1349	<,0001
Ác. Butírico (% MS)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	.	.	.
Etanol (% MS)	0,45	0,44	0,38	0,40	0,28 ^b	0,55 ^a	0,42	0,02	0,6358	<,0001

Médias seguidas por letras diferentes na linha são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (Tempo) ou teste F (Aditivo) - (P<0,05).

¹ Tempos entre picagem e fechamentos dos silos experimentais: 30, 90, 150 e 210 min;

² Erro padrão da média;

³ T = Efeito de tempos e A = Efeito de aditivos.

O ácido láctico foi o produto da fermentação de maior concentração, quando comparado aos demais produtos, o que condiz com o pH médio de 3,81, para ambas as silagens, controle e aditivada. Isso evidencia que todas as silagens fermentaram adequadamente. Os valores médios aqui obtidos estão próximos ao valor 3,7, encontrado por Nishida et al. (2007), que avaliaram a qualidade de silagens de milho no Japão. As silagens não aditivadas (controle) apresentaram uma tendência para maior concentração de ácido láctico. Esse fato pode ser explicado pela conversão potencial deste ácido em ácido acético pelo *L. buchneri* presente no inoculante utilizado (DRIEHUIS et al., 2001). Os tempos de ensilagem influenciaram o teor de ácido láctico, e essa diminuição com o aumento do tempo de exposição do material antes da ensilagem, está associada ao impedimento ao acesso a anaerobiose e à consequente fermentação do ácido láctico impedida por conta do atraso na vedação (Weiss, 2001). O menor teor verificado no maior tempo (210') pode ser devido ainda, ao consumo parcial de componentes solúveis por respiração, em função do tratamento proposto. Resultados semelhantes foram verificados por Brüning et al. (2018), avaliando o efeito do atraso de vedação na qualidade das silagens de milho. Para o ácido láctico, foi realizada a análise de correlação de Pearson entre os dados analisados via cromatografia (HPLC) e os valores encontrados nos laudos do 3RLAB, via NIRS e o coeficiente de correlação para essa variável foi baixo e negativo ($R = -0,12$).

As silagens inoculadas apresentaram maior teor de ácido acético, o que está de acordo com os resultados observados por outros pesquisadores que utilizaram BAL heterofermentativas e homofermentativas associadas (FILYA, 2003; KLEINSCHMIT et al., 2005; HU et al. 2009; SALVO et al., 2013). Nas silagens analisadas, observa-se um acréscimo de 56,0%, 54,9%, 56,3% e 57,8%, respectivamente, comparando os tratamentos controle x aditivado, em cada tempo avaliado. Esse aumento da produção de ácido acético com a expansão do tempo de ensilagem também foi relatado por Mills e Kung (2002), avaliando o efeito do retardo no processo de ensilagem de cevada.

Os teores de ácido acético apresentaram valores de 1,47 a 1,68% nas silagens controle e 2,32% a 2,62% nas silagens inoculadas. As silagens inoculadas apresentaram valor superior ao limite de 2,0% de ácido acético proposto por Roth e Undersander (1995) como referencial para classificar as silagens como de “boa qualidade”. No entanto, é importante salientar que esse conceito (acetato menor que 2% da MS classifica a silagem como excelente) que foi proposto no trabalho de Dulphy e Dermaquilly (1981) não é mais considerado na atualidade, já que a restrição da produção de ácido acético aumenta os riscos de instabilidade durante a exposição aeróbia do material (NUSSIO et al., 2002). A produção de ácido acético ocorre em função do metabolismo heterolático das BAL presentes na massa ensilada. Além disso, este

metabólito também pode ser produzido no início do processo fermentativo por enterobactérias que competem com as BAL pelos carboidratos disponíveis, reduzindo, assim, a produção de ácido láctico (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Todavia, apesar de ocorrer essa queda em termos de ácido láctico, o pH se manteve abaixo de 4,2, ou seja, a quantidade de ácido láctico produzido pelas bactérias inoculadas foi suficiente para assegurar o baixo pH. E o grande benefício que se observa com o uso do inoculante bacteriano é de fato o aumento nos teores de ácido acético e consequente elevação da estabilidade das silagens em aerobiose (TABELA 6). Para a variável ácido acético, a correlação de Person entre as análises via NIRS e HPLC foi alta e sem significância estatística ($R = 0,77$ e $p = 0,22$).

As silagens tratadas com o inoculante apresentaram teor de etanol médio 96% superior às silagens controle. Embora de magnitude pequena, esse efeito pode ser justificado pelas bactérias heteroláticas presentes no inoculante microbiológico aditivado, que assim como as leveduras, são capazes de produzir etanol a partir de açúcares (MUCK, 2010). Kleinschmit e Kung (2006), avaliando o padrão fermentativo de silagens de milho inoculadas com *L. buchneri* também descreveram o aumento na produção de etanol, pelo estímulo causado pelo próprio *L. buchneri*. A presença desse composto é indesejável, pois, além de ser volátil, pode ser tóxico aos microrganismos de interesse à silagem (McDONALD et al., 1991). No entanto, quantidades de até 2% de etanol na MS em silagens de milho são consideradas baixas, fato ocorrido em todos os tratamentos avaliados nesse experimento (KUNG e SHAVER, 2001).

No presente ensaio não foi detectada a presença de ácido butírico nas silagens avaliadas, assim como no trabalho de Rodrigues et al. (2002). De acordo com Hu et al. (2009), silagens de milho normalmente não apresentam ácido butírico em sua composição em função do pH baixo. O conteúdo de ácido butírico reflete a extensão da atividade clostridiana e está relacionado a maiores valores finais de pH. Segundo Tomich et al. (2003), valores entre 0 e 0,3% indicam boa fermentação e menores perdas de energia e MS. Todas as silagens foram influenciadas pelo tempo de ensilagem e pela interação entre o tempo e o inoculante utilizado, mas, não foi verificado efeito da inoculação sobre o pH do material (TABELA 4).

TABELA 4 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O pH DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

Variável		30	90	150	210
pH	Controle	3,77 ^{abB}	3,88 ^a	3,85 ^a	3,68 ^{bB}
	Aditivo	3,83 ^A	3,81	3,79	3,80 ^A

Médias com letras sobrescritas diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

O pH encontrado em todas as silagens avaliadas indica que a massa ensilada fermentou adequadamente, mesmo com o teor de MS da forragem ligeiramente abaixo da faixa normalmente recomendada, de 30 a 35% (TABELA 2).

Os valores de MS estão apresentados na TABELA 5. As silagens avaliadas apresentaram teores de MS condizentes com aqueles registrados na literatura. Schmidt et al. (2015), avaliando a produção de silagens de milho em diferentes regiões do país, verificaram que as silagens produzidas na região Sul são comumente mais úmidas que no resto do Brasil, em função do clima e das tomadas de decisão. Segundo Senger et al. (2004), o conteúdo de MS assume papel fundamental, aumentando a proporção de nutrientes, facilitando os processos fermentativos ou diminuindo a ação de microrganismos que afetam negativamente o valor nutricional da silagem.

TABELA 5 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE MS DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

Variável		30	90	150	210
MS	Controle	28,6 ^b	29,2 ^{aA}	28,5 ^b	28,5 ^{bA}
	Aditivo	28,8 ^a	28,3 ^{bB}	28,3 ^b	28,2 ^{bB}

Médias com letras sobrescritas diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

O maior teor de MS no tratamento controle era esperado, tendo em vista que o uso do inoculante elevou a produção de gases (TABELA 13), levando a maior perda de MS (TABELA 5). No entanto, apesar da diferença estatística entre os tratamentos controle e inoculado, as diferenças ocasionadas pelos tempos de exposição ao ar antes da ensilagem foram pequenas e difíceis de explicar.

A boa fermentação da silagem é dependente do teor de MS, concentração de carboidratos e capacidade tampão das culturas forrageiras. Nesse estudo o conteúdo de carboidratos solúveis da forragem nos diferentes tempos avaliados não apresentou diferenças expressivas (TABELA 2). Esse é um efeito inconsistente nos estudos avaliando tempos maiores (>10h) de exposição aeróbia da forragem antes do processo de ensilagem, que ilustraram

claramente que a respiração nos tecidos vegetais hidratados continua após o corte, ocasionando perdas acentuadas de carboidratos solúveis (BRÜNING et al., 2018; CAI et al., 2020). Entretanto, de acordo Kim e Adesogan (2006), os efeitos contrastantes de pequenos atrasos de vedação (<10h) não devem ser confundidos com os efeitos de atrasos prolongados. Muitas horas de exposição tendem a tornar o inoculante ou tratamento aditivo menos eficaz, aumentam o pH da silagem, proteólise e concentrações de proteínas danificadas pelo calor, além de acelerarem a deterioração (URIARTE, 2001). No caso do presente experimento, a ausência de diferenças no teor de CS entre os diferentes tempos pode ser resultado da continuidade da atividade enzimática sobre os mesmos durante o início da secagem em estufa, por tempo mais prolongado que os próprios tempos dos tratamentos propostos. Contudo, esse efeito não pôde ser mensurado no presente ensaio.

Pela análise dos efeitos do tempo de exposição ao ar antes da ensilagem em ambos os tratamentos (aditivo x controle), verifica-se que a permanência da forragem fresca ao ar antes da compactação elevou a concentração relativa de parede celular, incrementando os teores de FDN (TABELA 6) e FDA (TABELA 7).

TABELA 6 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE FDN DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

Variável		30	90	150	210
¹ FDN	Controle	47,9 ^b	46,6 ^{bB}	49,3 ^b	52,6 ^a
	Aditivo	47,0 ^b	49,5 ^{aA}	49,0 ^{ab}	50,5 ^a

Médias com letras sobrescritas minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

¹ Fibra em Detergente Neutro.

TABELA 7 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE FDA DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

Variável		30	90	150	210
¹ FDA	Controle	27,8 ^b	27,7 ^b	28,9 ^b	31,0 ^a
	Aditivo	27,2 ^b	29,3 ^a	28,5 ^{ab}	29,6 ^a

Médias com letras sobrescritas minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

¹ Fibra em Detergente Ácido.

Os teores de FDN aumentaram 4,7 e 3,5 pontos percentuais entre o primeiro e o último tempo avaliado no tratamento controle e aditivado, respectivamente. Em consonância, Rotz e Muck (1994) afirmam que a soma das perdas físicas ou a exaustão de nutrientes como os carboidratos solúveis ocasionam aumentos de 3 a 12% no teor de FDN na MS das silagens

produzidas. Destaca-se que o aumento nos teores de FDA indica pior valor nutritivo das silagens, já que existe uma correlação negativa entre os teores de FDA e a degradabilidade do alimento (VAN SOEST, 1994).

Segundo Dias (2002), as duas frações que mais representam a planta de milho são a FDN e o amido. Qualquer alteração nesses dois parâmetros resulta em grandes alterações no valor nutricional da planta de milho. A qualidade das silagens de milho é avaliada de acordo com seus teores de energia, por ser caracterizada pela alta quantidade de amido e baixos teores de PB. Com isso, a diminuição da quantidade de amido na silagem avaliada caracteriza queda acentuada do valor nutricional do alimento. Considerando-se os teores de amido descritos, observa-se que a vedação tardia ocasionou diminuição no teor de amido de forma significativa ($p < 0,05$) (TABELA 8).

TABELA 8 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE AMIDO DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

Variável		¹ 30	¹ 90	¹ 150	¹ 210
Amido	Controle	20,8 ^{ab}	22,5 ^{aA}	19,0 ^{bB}	15,8 ^{cB}
	Aditivo	22,7 ^a	20,1 ^{bB}	20,7 ^{abA}	18,6 ^{bA}

Médias com letras sobrescritas minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A degradação do amido, neste estudo, pode ter ocorrido por atividade hidrolítica das enzimas da própria planta antes da ensilagem, produzindo substratos adicionais de carboidratos para a fermentação do ácido lático (MUCK, 1988), ou para respiração microbiana. Mills e Kung (2002) avaliando o efeito do atraso na ensilagem de cevada descreveram observações semelhantes, mostrando que com o aumento do tempo de exposição do material antes da ensilagem os teores de amido diminuíram significativamente ($p < 0,05$).

O teor de PB foi significativamente influenciado pelo tempo de ensilagem, para as silagens controle (TABELA 9).

TABELA 9 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE PB DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

Variável		30	90	150	210
²¹ PB	Controle	8,07 ^a	8,11 ^a	8,13 ^a	7,66 ^{bB}
	Aditivo	8,17	8,21	8,26	8,19 ^A

Médias com letras sobscritas minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

¹ Proteína bruta.

A massa controle ensilada no tempo 30', apresentou concentração de PB maior que a ensilada no período de 210', o que pode ser explicado pela oxidação de componentes solúveis e proporcional aumento do N amoniacal. Os menores valores de PB apresentados pelo tempo de 210', deve-se possivelmente por conta de algum processo de proteólise. A proteólise inicial é mediada por enzimas da própria planta, enquanto as degradações subsequentes de aminoácidos ocorrem pela ação de microrganismos (TOMICH et al., 2003). De acordo, Muck (1987) a taxa de proteólise tem relação direta com a concentração de umidade da planta, presumivelmente porque a umidade estimula as enzimas proteolíticas da planta e da bactéria. Além disso, enterobactérias, que também vivem em condições de ensilagem úmida e quente (WOOLFORD, 1984), podem ocasionar proteólise. As silagens inoculadas apresentaram maior teor de PB que as silagens controle; como o uso de aditivos tem por finalidade preservar os nutrientes da silagem, seu efeito na avaliação das silagens foi considerado positivo. Os valores de PB das silagens avaliadas são levemente maiores do que os valores descritos por Rocha Jr. et al. (2003), de 7,25% de PB na MS e por Silva et al. (2005), de 7,68% de PB na MS para silagens de milho.

O teor de proteína solúvel foi elevado com o aumento do tempo de ensilagem, para as silagens controle, mostrando ainda interação entre o tempo e o aditivo, e não havendo significância para o uso do inoculante (TABELA 10).

TABELA 10 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE PS DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

Variável		30	90	150	210
¹ PS	Controle	63,8 ^b	61,5 ^{bB}	64,2 ^{ab}	67,1 ^a
	Aditivo	64,3	64,1 ^A	63,9	65,2

Médias com letras sobrescritas minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

¹ Proteína solúvel.

A solubilidade da proteína é um dos fatores que mais influi na degradação proteica a nível de rúmen. As proteínas mais solúveis tendem a ser mais rapidamente degradadas (CHALUPA, 1974 e TAMMINGA, 1979). As proteínas solúveis são aquelas que geralmente apresentam maior vulnerabilidade ao ataque proteolítico microbiano quando comparadas as proteínas insolúveis, pelo fato de as proteases terem um melhor acesso às proteínas quando elas estão em solução. Nessa perspectiva, observou-se que o aumento do tempo de ensilagem aumentou 3,3 pontos percentuais entre o tempo 30' e o tempo 210' para as silagens controle, com diferença estatística e 0,9 pontos percentuais entre o tempo 30' e o tempo 210' para as silagens inoculadas, mas sem diferença estatística. É importante, também, destacar que a solubilidade da proteína e outras interferências, presentes na fração solúvel das plantas, podem superestimar o teor de carboidratos solúveis (WISEMAN; MALLACK; JACOBSON, 1960). O aumento do tempo de ensilagem reduziu o teor de EE das silagens (TABELA 11).

TABELA 11 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA O TEOR DE EE DA SILAGEM, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

Variável		30	90	150	210
¹ EE	Controle	2,66 ^{aB}	2,75 ^a	2,53 ^{abB}	2,35 ^{bB}
	Aditivo	2,90 ^{aA}	2,75 ^{ab}	2,74 ^{bcA}	2,58 ^{cA}

Médias com letras sobrescritas minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

¹ Extrato etéreo.

Da mesma forma, silagens aditivadas apresentaram valores ligeiramente maiores de EE. Possivelmente, a exposição ao ar levou a maior oxidação e metabolismo dos lipídeos de reserva, por respiração celular (PEIXOTO et al., 2020). Comparando-se aos valores da forragem original, parece ter havido leve incremento do teor de EE nas silagens inoculadas, provavelmente decorrente da redução relativa de outros componentes usados na fermentação das silagens.

Em termos gerais, os dados apresentados da composição bromatológica das silagens avaliadas permitem entender que os intervalos de tempo estudados são grandes o suficiente para interferir negativamente na avaliação de um experimento. Suponhamos um ensaio onde o tratamento controle foi feito logo após a colheita e picagem (0-90 minutos), e um tratamento inoculado fosse realizado de 150 a 210 minutos após. Se nos detivermos apenas nas variáveis onde não houve efeito de aditivo (p. ex., FDN, FDA e lignina), concluir-se-ia que o aditivo teria elevado os teores da fração fibrosa, o que percebemos não ser verdade. É importante reforçar que os intervalos de tempos testados aqui, e até muito maiores que esses, são comumente adotados pelos grupos de pesquisa, sem maior questionamento sobre sua influência danosa aos dados obtidos. As perdas fermentativas das silagens de milho, nos quatro tempos de ensilagem, inoculadas ou não com *Pioneer 11C33* estão apresentadas na TABELA 12.

TABELA 12 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA A PERDA DE MS DA SILAGEM DURANTE A FERMENTAÇÃO, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

Variável		30	90	150	210
Perda de MS	Controle	3,05 ^a	1,77 ^{bB}	3,28 ^{aB}	3,36 ^{aB}
	Aditivo	3,08 ^b	4,41 ^{abA}	4,14 ^{abA}	4,73 ^{aA}

Médias com letras sobrescritas minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para a variável Perda de MS o efeito do inoculante foi altamente significativo ($p < 0,0001$). Segundo Ribeiro et al. (2005), a combinação de bactérias hetero e homofermentativas favorece a redução dos valores das perdas fermentativas em silagens tratadas. Entretanto, a maior perda de MS durante a fermentação no tratamento aditivado pode ser resultado dos maiores teores de etanol e ácido acético nessas silagens, pois a perda de gás oriunda do processo fermentativo das BAL heteroláticas representa MS perdida para o ambiente. Ainda, os valores apresentados não foram corrigidos para perda de voláteis em estufa, o que influencia diretamente a magnitude das perdas. A perda total de MS também foi significativamente influenciada pelo tempo de ensilagem. Os tratamentos ensilados no tempo 30', apresentaram perdas totais de MS menores que os ensilados no tempo 210'. Da mesma forma, Brüning et al. (2018) também observaram esse efeito avaliando perda total de MS em silagens de milho com diferentes tempos de exposição aeróbia antes da ensilagem (0, 2 e 4 dias).

Silagens inoculadas apresentaram maior produção de gás (Gprod) que as silagens controle (TABELA 13). Esse efeito já era esperado e pode ser justificado pelo metabolismo das BAL heterofermentativas, que são menos eficientes devido à formação de CO₂ durante seu

metabolismo. Os tempos de exposição ao ar antes da ensilagem também influenciaram nessa variável. A literatura apresenta diferentes respostas ao uso de inoculantes em relação às perdas geradas por gases, e isso está relacionado às diferenças entre as doses sobrepostas, estirpe das cepas e administração do produto, que pode interferir diretamente na ação das bactérias, além da própria metodologia utilizada para a avaliação, que é bastante variável.

TABELA 13 – PRODUÇÃO DE GASES E PERDAS FERMENTATIVAS DAS SILAGENS DE MILHO, EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

	Tempo				Aditivo		³ Efeitos			
Variável	30'	90'	150'	210'	Controle	<i>Pioneer 11C33</i>	Média	² EPM	T	A
¹ Gprod (L/kg MS)	5,71 ^b	5,81 ^b	5,78 ^b	6,27 ^a	5,70 ^b	6,02 ^a	5,87	0,07	0,0174	0,0243
Efluente (% MS)	1,62	2,19	1,33	1,34	2,12 ^a	1,20 ^b	1,64	0,18	0,2793	0,0127

¹ Volume de gás produzido na fermentação;

² Erro-Padrão da Média;

³ T = Efeito de tempos e A = Efeito de aditivos.

A produção de efluente nas silagens inoculadas foi inferior às silagens controle, embora a quantidade de efluente produzida possa ser considerada muito pequena para todos os tratamentos avaliados. A produção de efluente é influenciada por fatores como teor de MS da cultura ensilada, tipo de silo, grau de compactação e processamento físico da forragem (HAIGH, 1999).

As perdas por gases calculadas pela equação “tradicional” (PGtrad) foram pequenas, mas apresentaram efeito significativo do uso do aditivo e da interação aditivo x tempo (TABELA 14).

TABELA 14 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA A PRODUÇÃO DE GASES EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *PIONEER 11C33*

Variável		30	90	150	210
¹ PGtrad (%MS)	Controle	2,81 ^B	1,60 ^B	2,46 ^B	2,51 ^B
	Aditivo	3,00 ^A	4,87 ^A	3,37 ^A	3,98 ^A

Médias com letras sobrescritas diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

¹Perda por gases calculada pela equação tradicional, por diferença do peso bruto dos silos antes e depois da ensilagem;

As silagens apresentaram produção de gás (Gprod) por apenas oito dias após a vedação dos silos, e o volume de gás produzido na fermentação foi pequeno (FIGURA 3), e apresentou efeito significativo de tratamento, indicando que a elevação do tempo entre picagem e vedação dos silos eleva a produção de gás durante a fermentação, provavelmente em

decorrência do aumento da população de microrganismos aeróbios. As variáveis Gprod e PGtrad não estiveram correlacionados significativamente entre si ($R = 0,3997$ e $p = 0,3266$), embora ambas tenham apresentado efeito significativo do uso do aditivo. Em função dos erros de estimativa e da perda de MS na forma de voláteis durante a secagem das amostras em estufa, consideramos a observação direta do volume de gás produzido (Gprod) a variável mais segura para descrever as perdas na forma de gás em experimentos com silagens.

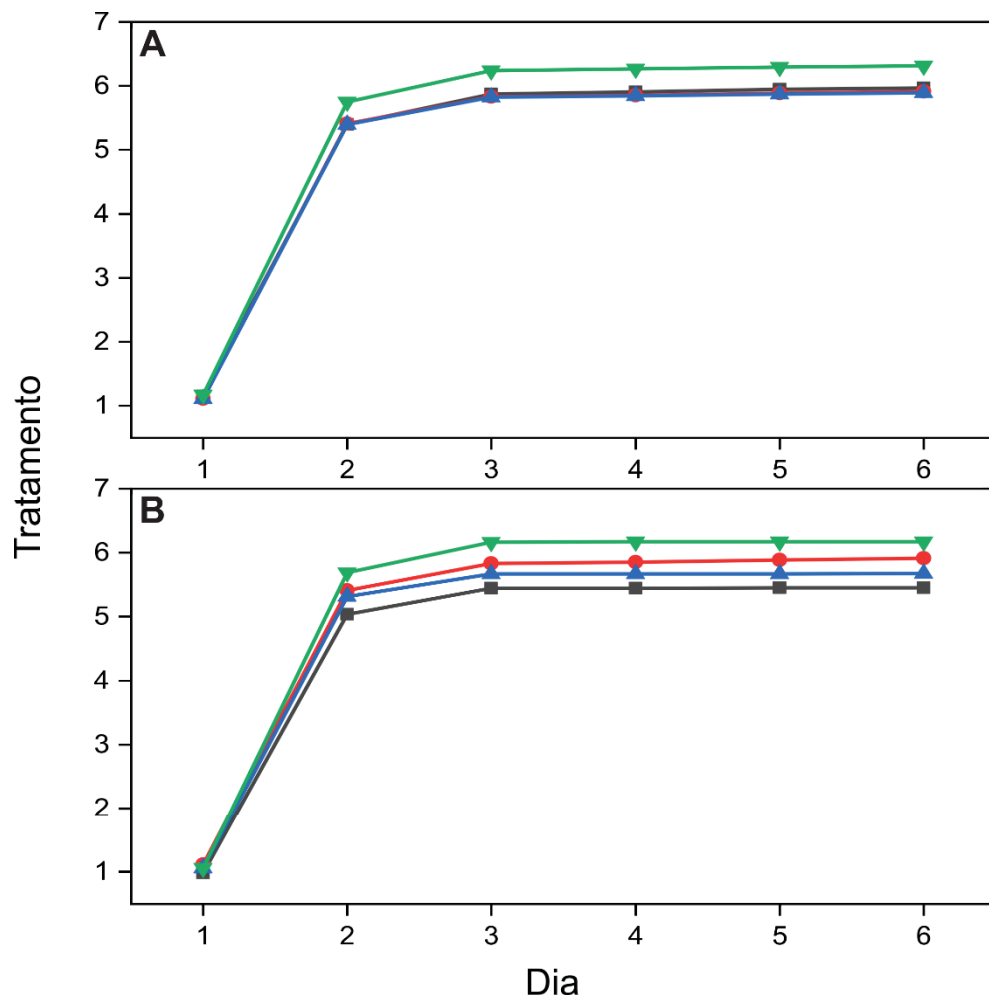


FIGURA 3 – PRODUÇÃO MÉDIA DE GASES ACUMULADA (L/kg MS) NO TRATAMENTO ADITIVADO (A) E NO TRATAMENTO CONTROLE (B)

LEGENDA: (■) 30 minutos, (●) 90 minutos, (▲) 150 minutos e (▼) 210 minutos.

Na FIGURA 3 pode-se observar que as maiores produções de gás foram registradas na fase inicial do processo (nas primeiras 24 horas) e essa taxa foi decrescendo até o oitavo dia, em virtude da elevada atividade respiratória inicial do oxigênio residual pela planta ensilada, juntamente com o desenvolvimento inicial das colônias de microrganismos fermentadores. Ao passar dos dias, acontece a diminuição desta taxa de produção de gases, em virtude da estabilização da atividade microbiana no interior da massa ensilada (JOBIM et al., 2007). As

silagens deste estudo apresentaram valores de produção de gás (Gprod) mais altos do que os apresentados por Souza (2015), de 4,69 L/kg MS. As silagens deste estudo apresentaram produção acumulada de gases de 5,70 e 6,02 L/kg MS, para os tratamentos controle e aditivado, respectivamente.

A importância de limitar a duração da exposição da forragem ao ar se dá principalmente pela menor concentração de ácido láctico e concentração residual de CS, o que indica fermentação menos extensa. Esse último diz respeito a uma fase respiratória mais longa devido a maiores tempos de exposição aeróbia da forragem, que pode esgotar os substratos fermentescíveis para o crescimento microbiano. No entanto, nesse estudo, devido aos tratamentos propostos, o tempo de até 210' não prejudicou de forma marcante as características fermentativas da silagem.

A contagem microbiana das silagens de milho é apresentada na TABELA 15. As diferenças entre os tempos de ensilagem não influenciaram a contagem dos microrganismos e o uso do inoculante apresentou apenas tendência ($p = 0,06$) de elevação na contagem de BAL, provavelmente em decorrência da maior sobrevivência de BAL heteroláticas provenientes do inoculante usado, ao longo do processo de fermentação. Os aditivos para silagem afetam o padrão de fermentação de diferentes maneiras, de acordo com seu modo de ação específico (KUNG et al., 2003).

É importante salientar que a contagem microbiana realizada não representa a dinâmica das populações nem seu tamanho ao longo do ensaio, mas apenas o número de UFC viáveis no momento da abertura dos silos. A população de BAL neste trabalho congloera tanto bactérias homoláticas, que têm o ácido láctico como produto da fermentação, quanto as heteroláticas, que têm como produtos de fermentação além do ácido láctico, acético, propiônico, etanol, CO₂ e água. Neste estudo não foi realizada a caracterização e identificação das espécies. Sá Neto et al. (2013) testaram *L. plantarum* combinado com *L. buchneri* em silagens de cana-de-açúcar e milho, e também não observaram alteração na composição microbiológica dessas silagens. De acordo com Schmidt (2008), a variabilidade do padrão de respostas à aplicação de lactobacilos parece ser superior à de outros aditivos, possivelmente, porque muitos fatores podem afetar o desenvolvimento dos microrganismos, como população epifítica, temperatura da silagem, ambiente, composição de carboidratos, entre outros. As implicações da utilização de aditivos combinados são de difícil interpretação, já que cada bactéria tem uma forma de atuação.

TABELA 15 – CONTAGENS MICROBIANAS EM SILAGENS DE MILHO EM QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

	Tempos ¹	Variável		
		BAL (log UFC/g)	Leveduras (log UFC/g)	Bolores (log UFC/g)
Controle (sem aditivos)	30'	7,68	4,86	3,78
	90'	7,59	5,15	3,90
	150'	>8,0	5,38	3,30
	210'	>8,0	4,52	3,48
	Média	7,81	4,98	3,61
<i>Pioneer 11C33</i>	30'	>8,0	3,30	3,78
	90'	>8,0	3,78	3,30
	150'	>8,0	3,90	3,30
	210'	-	3,78	3,90
	Média	>8,0	3,69	3,57
Efeito ³	EPM ²	0,57	0,09	0,03
	T	0,2722	0,5950	0,8547
	A	0,0614	0,1049	0,6211
	T*A	-	0,7352	0,6211

¹ Tempos entre picagem e fechamentos dos silos experimentais: 30, 90, 150 e 210 min;

² Erro-Padrão da Média;

³ T = Efeito de tempos, A = Efeito de aditivos e T*A = Interação entre Tempo e Aditivo.

De maneira geral, a média da população de leveduras diminuiu com o uso do inoculante, mas sem diferença estatística entre os tratamentos ($p = 0,10$). Sá Neto et al. (2013) avaliando a silagem de milho controle ou inoculada com *L. plantarum* e *L. buchneri*, também não encontraram diferença significativa para essa variável. As leveduras podem ficar dormentes durante a fase anaeróbia de produção das silagens, sem aumento da população (ROCHA et al., 2006), desde que haja carboidratos solúveis no meio (McDONALD et al., 1991). Contudo, as silagens avaliadas apresentaram menores valores de leveduras, quando comparadas com a forragem fresca (TABELA 2). O decréscimo eminente dessa população se dá em função da concentração de ácidos na silagem, pH e anaerobiose.

Não houve diferença na contagem de bolores nas silagens analisadas. Estes microrganismos são sensíveis aos ácidos acético e propiônico, assim como as leveduras. A ocorrência de bolores afeta o padrão de fermentação, gera produção de compostos tóxicos e pode resultar em silagens de qualidade insatisfatória (SANTOS et al., 2008). Provavelmente, o cuidado no processo de vedação dos silos experimentais foi satisfatório para inibir a população desses microrganismos, já que são mais influenciados pela presença de oxigênio do que pelo pH (PAHLOW et al., 2003).

Conforme apresentado na TABELA 16, as silagens inoculadas com o 11C33 não apresentaram quebra da estabilidade durante todo o período de avaliação (213 horas). Outros

estudos também relataram melhora da estabilidade aeróbia quando combinações de bactérias homoláticas e heteroláticas foram aplicadas em silagens (WEINBERG et al. 2002; FYLIA, 2003; ARRIOLA et al., 2011). As silagens sem aditivo apresentaram estabilidade relativamente alta, entre 62 e 90 horas, valores superiores aos descritos por Hu et al. (2009) e Balieiro Neto et al. (2009), para silagens de milho não inoculadas, de 50 e 53 horas, respectivamente.

A combinação de bactérias homoláticas e heteroláticas tem sido estudada em silagens de milho, a fim de se aliar o efeito positivo das homoláticas na fermentação decorrente da rápida queda do pH, causada pela elevada produção de ácido lático, e as vantagens das bactérias heteroláticas após a abertura, em razão da produção de ácido acético, eficiente no controle de leveduras e fungos filamentosos (HU et al., 2009; QUEIROZ et al., 2012).

TABELA 16 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA A EA DAS SILAGENS NOS QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

Variável		30	90	150	210
¹ EA	Controle	62,03 ^{cB}	80,35 ^{bB}	90,30 ^{aB}	89,13 ^{aB}
	Aditivo	>213 ^A	>213 ^A	>213 ^A	>213 ^A

Médias com letras sobrescritas minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

¹ Estabilidade aeróbia.

Segundo Woolford (1990), a deterioração aeróbia é de longe a maior fonte de perdas no processo de ensilagem. Com a infiltração de ar, microrganismos ácido tolerantes e aeróbios (facultativos) presentes na silagem começam a se desenvolver e proliferar, utilizando açúcares residuais e ácido lático como substrato, ocasionando perdas de matéria seca (PAHLOW et al., 2003). Por isso, é importante destacar que o controle marcante na deterioração aeróbia proveniente do uso do inoculante, ocorre pela maior concentração do ácido acético, produzido a partir da fermentação dos carboidratos solúveis e do ácido lático, e que possui efeito antifúngico.

No presente estudo a estabilidade aeróbia também foi influenciada pelos diferentes tempos de ensilagem, entretanto, apenas para as silagens controle. Da mesma forma, Brüning et al. (2018), avaliando silagens que foram vedadas no quarto dia pós-enchimento observaram menor estabilidade aeróbia (49 x 64 horas) quando comparadas às silagens vedadas imediatamente após o corte. De natureza similar, Araujo et al. (2020) observaram quebra da estabilidade aeróbia 46 horas após o início do ensaio, para o tratamento com 24 horas de exposição ao ar antes da ensilagem, enquanto a estabilidade aeróbia foi de 62 horas para as

silagens que foram confeccionadas logo após a colheita, evidenciando que o maior tempo do processo de ensilagem pode acarretar em menor estabilidade aeróbia das silagens.

De fato, a vedação atrasada, ou seja, uma exposição prolongada ao ar na fase de pré-vedação, pode permitir o desenvolvimento de maior população de leveduras. Esses microrganismos sobrevivem em parte ao processo de ensilagem, e após a abertura dos silos iniciam rápida proliferação, que por conseguinte contribui consideravelmente para a quebra mais rápida da estabilidade da massa ensilada.

A deterioração aeróbia da silagem está estritamente ligada ao aumento da temperatura e do pH devido à atuação das bactérias e leveduras no metabolismo dos carboidratos e ácidos orgânicos (SPOELSTRA et al., 1988), reduzindo consideravelmente a qualidade da silagem e decrescendo a concentração do ácido lático e dos carboidratos (KUNG, 2001).

Kung e Stokes (2002) afirmaram que a variação do pH durante o período de exposição ao ar pode ser um indicativo prático de que a silagem está sendo deteriorada. Assim, a presença do inoculante favoreceu melhor conservação da silagem após a exposição ao ar, de forma que mesmo após 213 horas de exposição ao ar o pH se manteve em 3,87 (FIGURA 4). Reforçamos aqui que resultados como esse são escassos na literatura, e estão relacionados a uma nova geração de inoculantes altamente eficazes na elevação da estabilidade das silagens.

O comportamento foi bastante consistente em todos os tempos, com a silagem inoculada, mantendo o pH baixo e praticamente sem alteração. As silagens tratadas com o aditivo, após as 213 horas de avaliação da estabilidade aeróbia, independentemente do tempo de ensilagem apresentaram menores valores de pH em relação ao Controle. Essa manutenção no valor de pH para as silagens inoculadas expostas ao ar indica que o aporte adicional de microrganismos foi responsável pela modificação da fermentação dos carboidratos presentes na biomassa. Ao contrário do esperado, para as silagens Controle o pH do tratamento 210' foi o de menor variação ao longo da exposição ao ar. Uma justificativa para esse efeito, está associada a maiores teores de ácido lático nos tratamentos que foram ensilados nos menores tempos (TABELA 3), pois este é um substrato que alguns dos microrganismos aeróbios utilizam como fonte de energia para crescimento e multiplicação de suas colônias. O metabolismo desse ácido resulta em aumento de pH da silagem, que consequentemente, desencadeia o crescimento de outros microrganismos indesejáveis (McDONALD; HENDERNSON; HERON, 1991). Nos tratamentos com maior tempo de exposição antes de serem ensilados provavelmente houve também consumo de compostos solúveis precursores do ácido lático, reduzindo a relação ácido lático:acético, o que pode ter levado à manutenção da estabilidade em aerobiose por mais tempo.

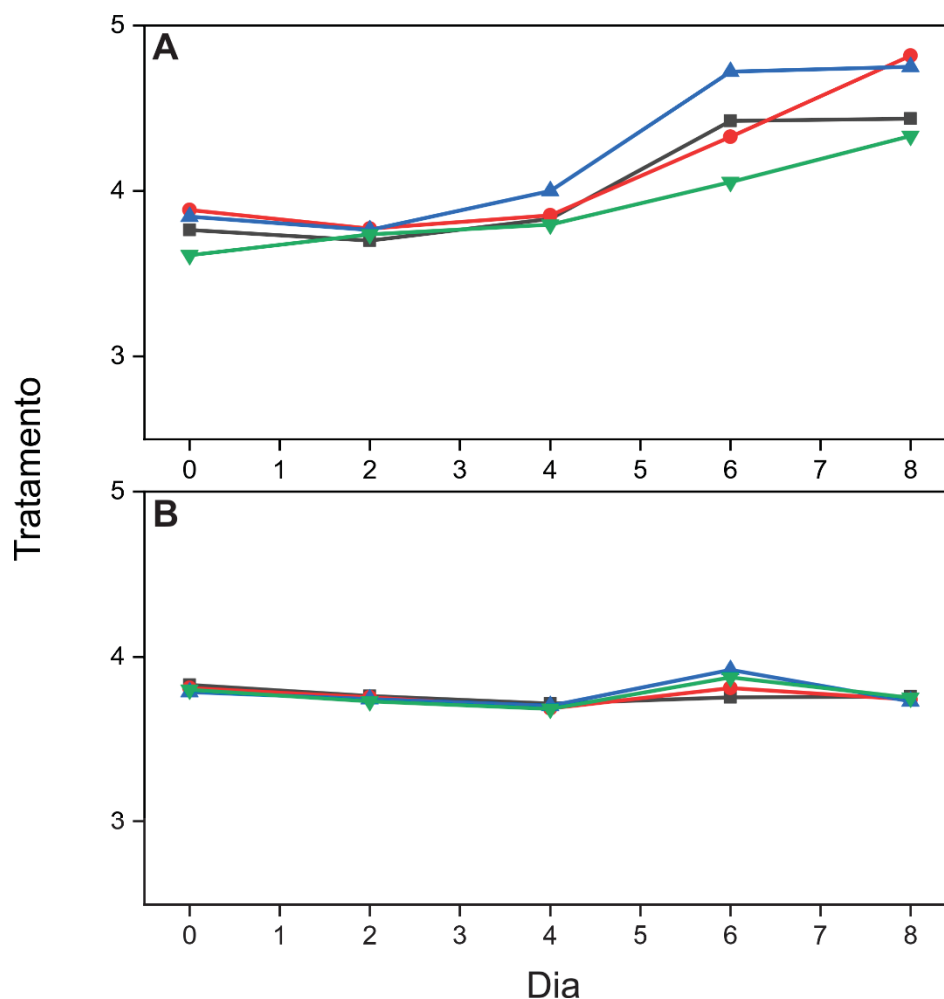


FIGURA 4 – CURVA DE pH ENTRE OS TRATAMENTOS CONTROLE (A) E ADITIVADO (B) NOS DIFERENTES TEMPOS AVALIADOS DURANTE A O TESTE DE ESTABILIDADE AERÓBIA

LEGENDA: (■) 30 minutos, (●) 90 minutos, (▲) 150 minutos e (▼) 210 minutos.

É importante destacar que durante a realização do ensaio de avaliação de EA houve uma queda de árvore e rompimento da rede de energia, comprometendo o controle de temperatura da sala. Por isso, boa parte da avaliação foi realizada em temperatura ambiente (FIGURA 5). Em silagens, os principais fatores que afetam o crescimento dos microrganismos aeróbios são a presença de substratos fermentescíveis, temperatura ambiente e a disponibilidade de oxigênio. As silagens de milho são mais susceptíveis à deterioração aeróbia em climas quentes (BASSO et al., 2012), e provavelmente em virtude da baixa temperatura do ambiente durante parte do ensaio (12-18 °C), as silagens sem aditivo apresentaram estabilidade relativamente alta, e baixas perdas de MS durante a EA. Confirmando essa afirmativa, Ashbell et al. (2002) analisaram os efeitos da temperatura na estabilidade aeróbia em silagens de milho e verificaram que à temperatura de 30 °C as perdas iniciaram após três dias de exposição, enquanto que apenas no sexto dia os materiais expostos a 20 °C manifestaram perdas aeróbias.

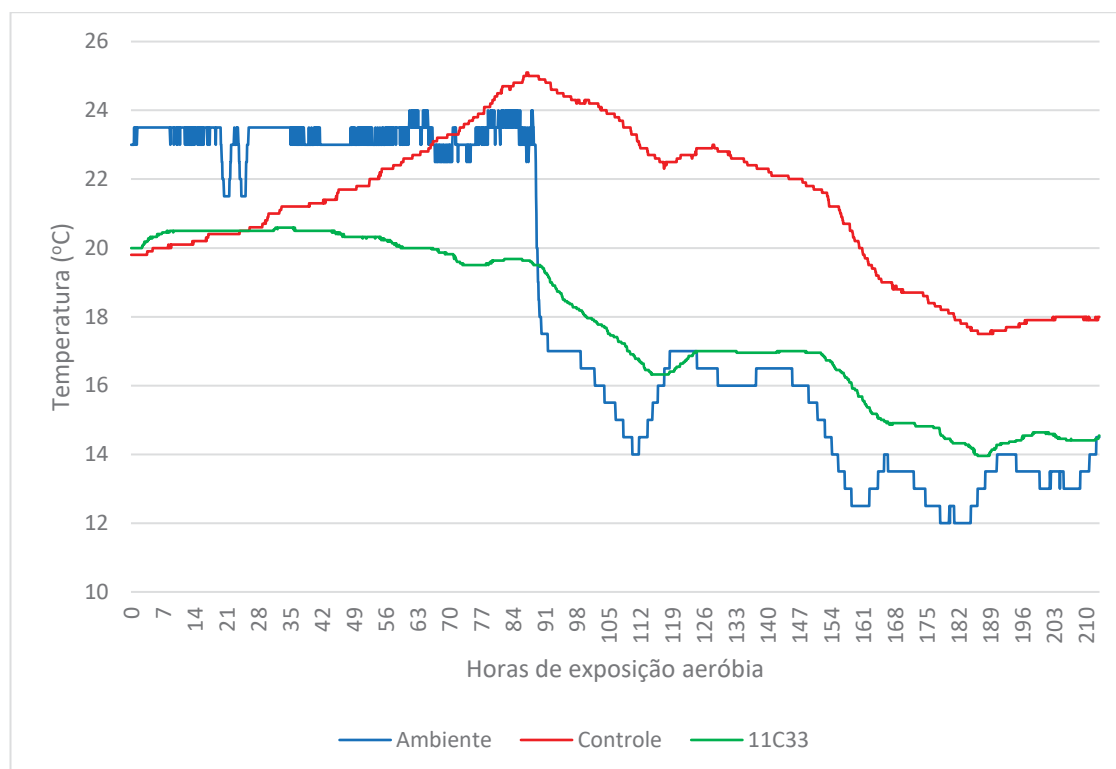


FIGURA 5 – VARIAÇÃO NA TEMPERATURA DURANTE A AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE AERÓBIA DAS SILAGENS

Neste experimento, a oscilação da temperatura durante a exposição das silagens ao ar pode ter proporcionado breves períodos de temperatura ótima para o desenvolvimento dos microrganismos aeróbios. Portanto, estas condições podem ter limitado o crescimento dos microrganismos envolvidos no processo de deterioração das silagens.

Para a variável perda de matéria seca durante a exposição aeróbica (PMSea) observou-se efeito significativo para o uso do aditivo ($p = 0,0011$) e para a interação aditivo x tempo ($p = 0,0435$) (TABELA 17).

TABELA 17 – DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES TEMPO X ADITIVO PARA A PMSea DAS SILAGENS NOS QUATRO TEMPOS DE ENSILAGEM (30 A 210 MINUTOS), INOCULADAS OU NÃO COM *Pioneer 11C33*

Variável		30	90	150	210
¹ PMSea	Controle	7,84 ^A	8,71 ^A	6,19	6,56 ^A
	Aditivo	5,47 ^B	5,46 ^B	6,71	4,75 ^B

Médias com letras sobrescritas maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

¹ Perda de matéria seca durante a estabilidade aeróbica.

O maior teor de ácido láctico nas silagens do tratamento controle é coerente com a maior PMSea observada neste tratamento, pois os microrganismos envolvidos na deterioração de silagens consomem principalmente o ácido láctico para obtenção de energia (McDONALD et

al., 1991). O consumo do ácido láctico, que apresenta o menor pKa dentre os ácidos presentes nas silagens, provoca aumento do pH, indicando que houve degradação do material.

A intenção primária deste experimento foi compreender qual o efeito de tempos relativamente curtos de exposição ao ar da forragem fresca antes do processo de ensilagem, na qualidade da silagem produzida em ensaios experimentais. Ao contrário do observado com longos períodos de exposição ao ar da planta ensilada em situações de campo, nenhum silo apresentou aspectos característicos de silagem deteriorada, tampouco alterações na composição bromatológica que afetassem significativamente a qualidade da silagem. Contudo, as diferenças observadas, e as interações entre tempos e aditivos, permitem afirmar que a exposição ao ar por diferentes tempos entre os tratamentos pode comprometer as conclusões advindas dos ensaios experimentais com silagens. A intenção secundária foi verificar qual a influência dessa exposição na efetividade do aditivo utilizado e nas respostas experimentais à sua aplicação, relativas à estabilidade aeróbia das silagens; nesse sentido, mesmo o maior tempo de exposição do tratamento 210' não comprometeu a efetividade do inoculante avaliado.

Grupos de pesquisa que realizam ensaios em silos experimentais devem padronizar e registrar os tempos de montagem dos ensaios, sabendo que essas variáveis podem comprometer os resultados. Recomenda-se que todos os tratamentos sejam realizados de forma concomitante, e no menor intervalo de tempo possível, de acordo com os objetivos do ensaio em questão.

4 CONCLUSÕES

Todas as silagens avaliadas apresentaram um bom padrão de fermentação. A elevação nos tempos de exposição ao ar antes da ensilagem eleva as perdas fermentativas e reduz a qualidade da silagem. Os tempos estudados, se negligenciados, podem influir na avaliação dos resultados de um ensaio com aditivos e levar a resultados equivocados.

O aditivo microbiano utilizado foi ineficiente em reduzir as perdas fermentativas, mas elevou de forma marcante a estabilidade aeróbia e melhorou o valor nutricional das silagens.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As metodologias empregadas na avaliação da ensilagem em ensaios experimentais são dinâmicas e, por isso, extremamente complexas. A grande contribuição que este trabalho traz para a pesquisa é o auxílio na condução metodológica desses ensaios. O tempo de ensilagem, como demonstrado na revisão bibliográfica deste estudo e comprovado no ensaio realizado, tem impacto direto nas características da silagem produzida, por isso, a interpretação das metodologias existentes deve ser cautelosa, com atenção aos processos que a forragem fresca sofre até chegar aos valores finais das características da silagem produzida, a fim de evitar avaliação equivocada dos parâmetros estudados.

Rotineiramente os experimentos são realizados sem o controle do tempo de ensilagem entre os tratamentos propostos, sem levar em consideração que diferentes tempos implicam em respostas diferentes das variáveis analisadas. Com o uso do inoculante, respostas equivocadas podem interferir ainda mais nesses estudos, podendo as respostas das variáveis serem modificadas em função do tempo e não como resposta ao uso do inoculante.

A aplicação prática de manejo, tendo em vista a qualidade do material ensilado começa no campo e continua ao longo de todo o processo de ensilagem, por isso, minimizar os erros experimentais e padronizar as metodologias aplicadas na condução dos ensaios é premissa básica para a comparação idônea dos resultados entre os diferentes grupos de pesquisa. Assim, novas metodologias que determinem que os tratamentos sejam ensilados concomitantemente deverão ser aplicadas. Essas metodologias devem oferecer maior exatidão nas comparações das variáveis estudadas.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C. A. et al. Efeito do Tempo de Ensilagem sobre a composição química, perfil Fermentativo e Estabilidade Aeróbia de Silagens de Milho (*Zea mays*). **Diversitas Journal**, v. 5, n. 1, p. 547-561, 13 jan. 2020.
- ARRIOLA, K. G.; KIM, S. C.; ADESOGAN, A. T. Effect of applying inoculants with heterolactic or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation and quality of corn silage. **Journal of Dairy Science, Champaign**, v.94, p. 1511 – 1516, 2011.
- ASHBEILL, G. et al. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 28: 261-263, 2002.
- BALIEIRO NETO, G. et al. Perdas fermentativas e estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar aditivadas com cal virgem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.24-33, 2009.
- BASSO, F. et al. Fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silages inoculated with different levels of *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 11, p. 2369-2373, 2012.
- BUENO, A. V. I. et al. Natamycin as a potential silage additive: A lab trial using sugarcane to assess greenhouse gas emissions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 49, 2020.
- CAI, Y. et al. Influence of microbial additive on microbial populations, ensiling characteristics, and spoilage loss of delayed sealing silage of Napier grass. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 33, n. 7, p. 1103, 2020.
- CHALUPA, W. Rumen bypass protection of amino acids. **Journal of Dairy Science**, v.58, n.8, p.1198-1217, 1974.
- BRÜNING D., et al. Efeito da compactação, selagem retardada e exposição aeróbia na qualidade da silagem de milho e na formação de compostos orgânicos voláteis. **Grass Forage Science**, pp. 53 – 66, 2018.
- DIAS, F.N. Avaliação de parâmetros agronômicos e nutricionais em híbridos de milho (*Zea mays* L.) para silagem. 2002. 96f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- DULPHY, J. P.; DEMARQUILLY, C. Problèmes particuliers aux ensilages. **Previsión de la valeur nutritive des aliments des ruminants**. Paris: INRA publications, 1981. p. 81-104. v. 81, 1981.
- DRIEHUIS, F. et al. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v. 56, n. 4, p. 330-343, 2001.
- FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of Dairy Science**, 86: 3575-3581, 2003.

HAIGH, P.M. Effluent production from grass treated with additives and made in large scale bunker silos. **Grass and Forage Science**, v.54, p.208-218, 1999.

HALL, M.B.; HOOVER, W.H.; JENNINGS, J.P.; MILLER WEBSTER, T.K. A method for partitioning neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture** **79**, 2079–2086, 1999.

HU, W. et al. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.3907-3914, 2009.

JOBIM, C. C. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade de forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, p. 101-119, 2007.

KIM S.C.; ADESOGAN A.T. Influence of ensiling temperature, simulated rainfall, and delayed sealing on fermentation characteristics and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, **89**, 3122– 3132, 2006.

KLEINSCHMIDT, D.H.; KUNG JR., L. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. **Journal of Dairy Science**. **89**, 4005–4013, 2006.

KLEINSCHMIT, D.H. et al. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, **88**: 2130-2139, 2005.

KUNG JR., L. Aditivos microbianos e químicos para silagem – Efeitos na fermentação e resposta animal. In: **Workshop Sobre Milho para Silagem**, 2, Piracicaba, 2000. FEALQ, 2001. p. 53 – 74.

KUNG JR., L.; GRIEVE, D. B.; THOMAS, J. W.; HUBER, J. T. Added ammonia or microbial inoculant for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, **67**:299-306, 1984.

KUNG JR., L. et al. (Eds.) **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA. p.305-360, 2003.

KUNG JR., L.; STOKES, M.R. **Analyzing silages for fermentation end products**. 2002.

KUNG, L.; SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. **Focus on Forage No. 13**. 3:1-5, 2001.

MCDONALD, P.N.; HENDERSON, N.; HERON, S. **The Biochemistry of Silage**, second ed. Chalcombe Publications, UK, 1991.

MILLS, J. A; KUNG L JR. The effect of delayed ensiling and application of a propionic acid-based additive on the fermentation of barley silage. **Journal of Dairy Science**. **85**: 1969 – 1975, 2002.

MUCK, R.E. Dry matter level affects alfalfa silage quality: Nitrogen transformations. **Trans. ASAE**, **30**:7–14, 1987.

MUCK, R. E. Factors influencing silage quality and their implications for management. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 11, p. 2992– 3002, 1988.

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, (supl. especial), p. 183-191, 2010.

NISHIDA, T. et al. Digestibility, methane production and chewing activity of steers fed whole-crop round bale corn silage preserved at three maturities. **Animal Feed Science Technology**, v.135, p.42-51, 2007.

NOVINSKI, C.O. Respostas de aditivos microbianos em silagens de milho armazenadas em duas temperaturas distintas e avaliação da dinâmica de produção e fixação de gases durante o processo fermentativo. **Tese (Doutorado em Zootecnia)**. Universidade Federal do Paraná, 118p. Curitiba, 2018.

NUSSIO, L.G. et al. Ensilagem de capins tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTEKNIA, 39., 2002, Recife. **Anais... Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia**, p.60-99, 2002.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. Ed. Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. 2003. **Silage science and technology**, Madison, Wisconsin, USA. 2003.

PAULETTI V.; MOTTA A. C. V. Manual de adubação e calagem para o estado do Paraná. Curitiba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Núcleo Estadual Paraná, 2017.

PEIXOTO, C.P. et al. **Princípios de fisiologia vegetal: teoria e prática**. - 1. ed. - Rio de Janeiro, p 138-139, 2020.

PERKINS, A.E.; PRATT, A.D. A laboratory silo and its uses. **Journal of Dairy Science**, v.34, p.606-614, 1951.

PUPO, N.I.H. **Manual de pastagens e forrageiras: formação, conservação, utilização**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. p.274-303, 2002.

QUEIROZ, O.C.M. et al. Effect of a dualpurpose inoculant on the quality and nutrient losses from corn silage produced in farmscale silos. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.3354-3362, 2012.

RIBEIRO, J. L. et al. Desenvolvimento de aditivos microbianos para ensilagem: realidade e perspectivas. **Volumosos na produção de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p. 1-23, 2005.

ROCHA JR., V.R. et al. Estimativa do valor energético dos alimentos e validação das equações propostas pelo NRC (2001). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.2, p.480-490, 2003.

ROCHA, K. D. et al. Valor nutritivo de silagens de milho (*Zea mays* L.) produzidas com inoculantes enzimo-bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35:389-395, 2006.

RODRIGUES, P. H. M. et al. Efeitos da adição de inoculantes microbianos sobre a composição bromatológica e perfil fermentativo da silagem de sorgo produzida em silos experimentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.6, p.2373-2379, 2002.

ROTH, G.; UNDERSANDER, D. Silage additives. In: **Corn Silage Production Management and Feeding**. MADISON: Madison American Society of Agronomy, p.27-29. 1995.

ROTZ, C.A.; MUCK, R.E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: FAHEY Jr., G.C.; MOSER, L.E.; MERTENS, D.R. et al. (Eds.) **National conference on forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: University of Nebraska, p.828-868, 1994.

SALVO, P.A.R. et al. Características de silagens de milho inoculadas com *Lactobacillus buchneri* e *L. plantarum*. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 62, n. 239, p. 379-390, 2013.

SÁ NETO, A. et al. Silagem de milho ou de cana-de-açúcar com *Lactobacillus buchneri* exclusivamente ou em associação com *Lactobacillus plantarum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 48:528-535, 2013.

SANTOS, M. C. et al. Microbiologia de forragens conservadas e suas aplicações. In: **Produção e utilização de forragens conservadas**. Maringá, p.101-115, 2008.

SCHMIDT, P. Aditivos químicos e biológicos no tratamento de cana-de-açúcar para alimentação de bovinos. In: JOBIM, C.C.; CECATO, U.; CANTO, M.W. (Ed.). **Produção e utilização de forragens conservadas**. Maringá: Masson, p.117-152, 2008.

SCHMIDT P. et al. M. Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage: a farm survey using infrared thermography. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6609-6619, 2015.

SENGER, C. C. D. et al. Influência da umidade e compactação sobre os carboidratos estruturais e glicídios solúveis de silagens de milho. **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, v. 41, p. 2004, 2004.

SILVA, A. V. et al. Composição Bromatológica e digestibilidade in vitro da matéria seca de silagens de milho e sorgo tratadas com inoculantes microbianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 34:1881-1890, 2005.

SOUSA, D.P. et al. Efeito de aditivo químico e inoculantes microbianos na fermentação e no controle da produção de álcool em silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.9, p.1564-1572, 2008.

SOUZA, C.M. Impacto ambiental da produção de silagens: revisão da literatura e avaliação experimental em silos laboratoriais. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná, 131p, Curitiba, 2015.

SPOELSTRA, S.F. et al. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. **Journal of Agriculture Science**. Cambridge, v. 111, p. 127-132, 1988.

TAMMINGA, S. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. **Journal of Animal Science**, v.49, n.6, p. 1615-1632, 1979.

TOMICH, T. R. et al. Características químicas para avaliação do processo fermentativo de silagens: uma proposta para qualificação da fermentação. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, 20p, 2003.

URIARTE, M.E. Aerobic stability of corn silage. **PhD Diss.**, Kansas State University, Manhattan, 2001.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University, 1994.

WEINBERG, Z. G. et al. Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 7-11, 2002.

WEISS, K. (2001). Gärungsverlauf und Gärqualität von Silagen aus nitratararmen Grünfütter. **Doctoral thesis**. Germany (in German), 2001.

WISEMAN, W. G. H.; MALLACK, J. C.; JACOBSON, W. C. Silage analysis, determination of sugar in silages and forages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 8, p. 78-80, 1960.

WOOLFORD, M.K. The detrimental effects of fair on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 101-116, 1990.